



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**LA PROTEÍNA ATG16L1 REGULA EL PROCESO  
DE CARCINOGENÉISIS EN UN MODELO DE  
CÁNCER ORAL**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL TITULO DE  
BIÓLOGA**

**PRESENTA:**

**DANIELA MENDIOLA MENDOZA**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**DR. JOSÉ LUIS REYES HERNÁNDEZ**



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## DEDICATORIA

*Dedicado a mis padres:  
Yulma Mendoza y Manolo Mendiola.*

## AGRADECIMIENTOS

Primero quiero agradecer a mis padres **Yulma Mendoza y Manolo Mendiola**, por todo el apoyo que me han brindado durante toda mi vida, por los valores que han forjado en mí. Por darme su amor, confianza, cuidado y consejos, con los cuales no hubiera llegado hasta donde estoy.

A mis hermanas **Frida, Meritxell y Kenia**, gracias por su respaldo, sus consejos, por siempre estar cuando las necesito y por siempre alentarme a cumplir mis metas.

A mis amigas de la carrera **Aurora, Fátima, Mariana, Tania y Ximena**, a las cuales estoy feliz de haber conocido, gracias por hacer menos complicada la carrera, por los momentos de risas y diversión, pero también gracias por estar en los momentos difíciles. Forman parte de mi progreso y sin ustedes no lo hubiera logrado.

A mi asesor de tesis **Dr. José Luis Reyes Hernández**, gracias por aceptarme en el laboratorio, por su paciencia, sabiduría, entusiasmo y disposición para brindarme sus conocimientos. Gracia por sus consejos, su amistad y por todo el apoyo que me ha dado durante todo este tiempo.

A mi técnica y parte de mi comité tumoral **Biol. Marisol Ibet González González**, gracias por todas las técnicas aprendidas, por darme todas las herramientas para hacer siempre un buen trabajo. Por su paciencia, confianza y apoyo durante mi estancia en el laboratorio.

En general a todas las personas que conforman el **laboratorio 18 de la UBIMED**, gracias por enseñarme y apoyarme cuando lo necesite y por hacer más amena mi estancia en el laboratorio.

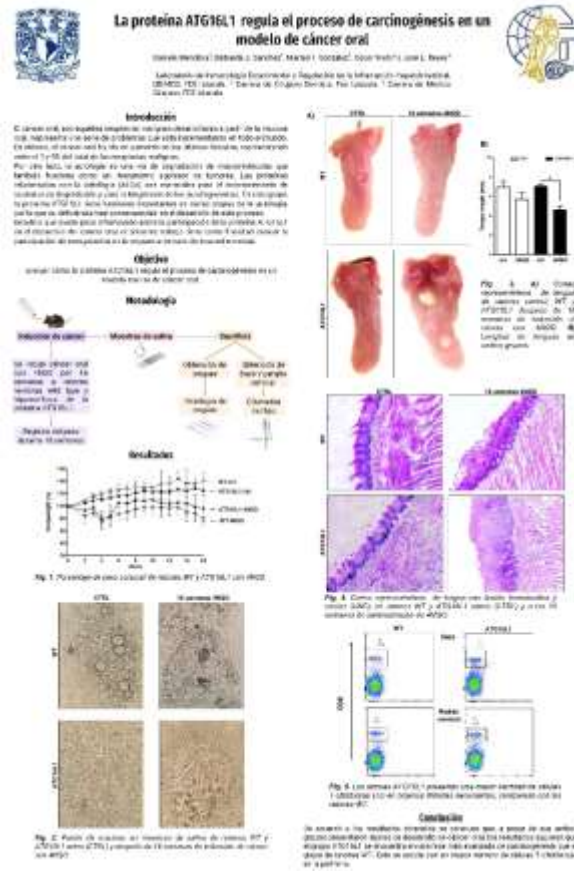
Al resto de mi comité tutorial **Dra. Betsaida Julieta Ortiz Sánchez, Dr. Oscar De Jesús Nieto Yañez y Dr. José Bustos Arriaga**, por su disposición y tiempo para enseñarme y por las aportaciones hechas a esta tesis.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, gracias por la formación académica, por los mejores años de mi vida y por ser mi segundo hogar.

A la Dra. María Leticia Flores Sánchez y el Biol. Tomas Ernesto Villamar Duque por el apoyo brindado en la reproducción de los animales utilizados para realizar este proyecto.

Este proyecto fue apoyado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Innovación Tecnológica (PAPIIT) número de proyecto IN224520.

Los avances de este proyecto se presentaron en el Coloquio de Investigación de la FES Iztacala agosto 2022.





## ÍNDICE

<b>1. RESUMEN</b> .....	1
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	3
2.1. Cáncer oral de células escamosas.....	3
2.2. Desarrollo de COCE.....	4
2.3. Epidemiología del cáncer oral.....	5
2.4. Autofagia.....	6
2.5. Proteína ATG16L1.....	8
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	9
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	9
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	10
5.1. Objetivo general.....	10
5.2. Objetivos particulares.....	10
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	11
6.1. Modelo de cáncer oral.....	11
6.2. Histología de lenguas.....	11
6.3. Patrón de mucinas en saliva.....	12
6.4. Hematocrito.....	12
6.5. Cultivo celular de bazo y ganglio cervical.....	12
6.6. ELISA.....	12
6.7. Citometría de flujo.....	13
6.8. Análisis estadístico.....	13
<b>7. RESULTADOS</b> .....	14
7.1. Peso corporal.....	14
7.2. Análisis macroscópico de la lengua y paladar.....	16
7.3. Daño histopatológico.....	20
7.4. Patrón de mucinas en saliva.....	23
7.5. Hematocrito.....	26
7.7. Citometría de flujo.....	30

<b>8. DISCUSIÓN</b> .....	32
<b>9. CONCLUSIÓN</b> .....	39
<b>10. LITERATURA CITADA</b> .....	40
<b>ANEXO TÉCNICO</b> .....	45
1. Anexo 1. Tren de deshidratación e inclusión de tejidos .....	45
2. Anexo 2. Tren de tinción hematoxilina y eosina .....	45



## 1. RESUMEN

El cáncer oral son aquellas neoplasias malignas desarrolladas en la mucosa oral. Representa una serie de problemas que incrementa en todo el mundo. En México, el cáncer oral ha ido en aumento en las últimas décadas, representan entre el 1 y 5% del total de las neoplasias malignas. Por otro lado, la autofagia es una vía de degradación de macromoléculas que también funciona como un mecanismo supresor de tumores. El proceso de autofagia depende del ensamble de complejos formados por las proteínas codificadas por los genes asociados a autofagia (autophagy-related genes, ATGs). La proteína ATG16L1 tiene funciones importantes en varias etapas de la autofagia, por lo que su deficiencia trae como consecuencia una disminución significativa en el desarrollo de este proceso. Por esa razón, el objetivo de este trabajo fue evaluar cómo la proteína ATG16L1 regula el proceso de carcinogénesis en un modelo murino de cáncer oral. Para ello, se indujo cáncer oral con 4NQO a ratones silvestres (wild type, WT) y ratones hipomórficos de la proteína ATG16L1 (ATG16L1<sup>HM</sup>) hembras y machos. Entre la metodología empleada se registró el peso de los organismos durante 16 semanas, se realizó extracción de lenguas y paladar, se registró la longitud y se realizó la histología de las lenguas, así como el análisis del patrón de mucinas salivales, se cuantificaron las concentraciones de interleucina 4 (IL-4) e interleucina 15 (IL-15) por ELISA en cultivo celular de bazo, ganglios cervicales y suero sanguíneo de los grupos WT 4NQO y ATG16L1<sup>HM</sup> 4NQO y citometría de flujo para determinar el porcentaje de linfocitos B en bazo. En los resultados, se aprecia la disminución del peso corporal, asociada a la progresión de la enfermedad. Los ratones ATG16L1<sup>HM</sup> fueron más susceptibles al desarrollo de COCE, como se evidencia en la presencia de lesiones macroscópicas y en el daño histopatológico avanzado en los tejidos de la lengua, aunque no se encontraron cambios en el paladar en ninguno de los grupos experimentales. Los grupos WT y ATG16L1<sup>HM</sup> con 4NQO tanto en hembras como en machos, presentaron daño en el patrón de mucinas salivales. Los datos de hematocrito no evidenciaron alteración en el número de células rojas. Se encontró mayor concentración de IL-4 en cultivo celular de bazo y ganglio cervical de ATG16L1<sup>HM</sup> 4NQO (sin estimular), podría estar asociada a la progresión de la enfermedad en este grupo, pero al estimular las células de bazo y ganglio cervical con concanavalina A, se encontró una menor concentración de IL-4 en ATG16L1<sup>HM</sup> 4NQO, lo que

nos sugiere un agotamiento de linfocitos T en este grupo, en suero sanguíneo fue mayor la concentración de esta interleucina en WT hembras, ya que esta puede ser secretada por otras células. Se encontró mayor concentración de IL-15 en el grupo WT, lo que nos sugiere un mejor pronóstico de la enfermedad para este grupo. Por último, se observó un mayor porcentaje de linfocitos B en el grupo ATG16L1<sup>HM</sup> 4NQO, lo cual podría estar asociado a un mal pronóstico de la enfermedad. Así, los resultados sugieren que el grupo ATG16L1<sup>HM</sup> es más susceptible al desarrollo de carcinogénesis oral que el grupo de ratones WT.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. CÁNCER ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS

El cáncer son enfermedades que se ocasionan cuando el organismo produce células en exceso, esto por adquisición de mutaciones que alteran el equilibrio entre renovación y muerte celular. El cáncer oral se agrupa junto con el cáncer de cabeza y cuello, en el caso del cáncer de la cavidad oral, representa aquellas neoplasias malignas desarrolladas a partir de la mucosa oral. Por lo que puede desarrollarse en: labio, lengua, piso de la boca, mucosa bucal, encía superior e inferior, trígono retromolar y paladar duro (García y Bascones, 2009; Montero y Patel, 2015; Rabinovich et al, 2013).

En la cavidad oral pueden surgir dos tipos de cáncer, el carcinoma oral de células escamosas o epidermoide (COCE), este el más común, debido a que el 90% de los canceres se originan en las células escamosas. Por otro lado, están los carcinomas de células no escamosas, estos se presentan en menor cantidad, derivan del epitelio, tejido conectivo, glándulas salivales menores, tejido linfoide y melanocitos o metástasis de un tumor distante (Montero y Patel, 2015; Rivera, 2015).

Los principales factores de riesgo desencadenantes del cáncer oral son el consumo de tabaco y alcohol, el tabaco contiene muchos componentes carcinógenos, además, se ha observado un efecto sinérgico entre el tabaco y el alcohol. En menor medida se puede presentar por la dieta (deficiencias dietéticas y consumo de carnes rojas en exceso), inmunosupresión (pacientes con virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)), enfermedad periodontal, infecciones (por el virus del papiloma humano (VPH)), radiación, alteraciones genéticas (xeroderma pigmentoso, anemia de Fanconi y ataxia telangiectasia, tienen una mayor incidencia en cáncer de cabeza y cuello), etc (García y Bascones, 2009; Montero y Patel, 2015).

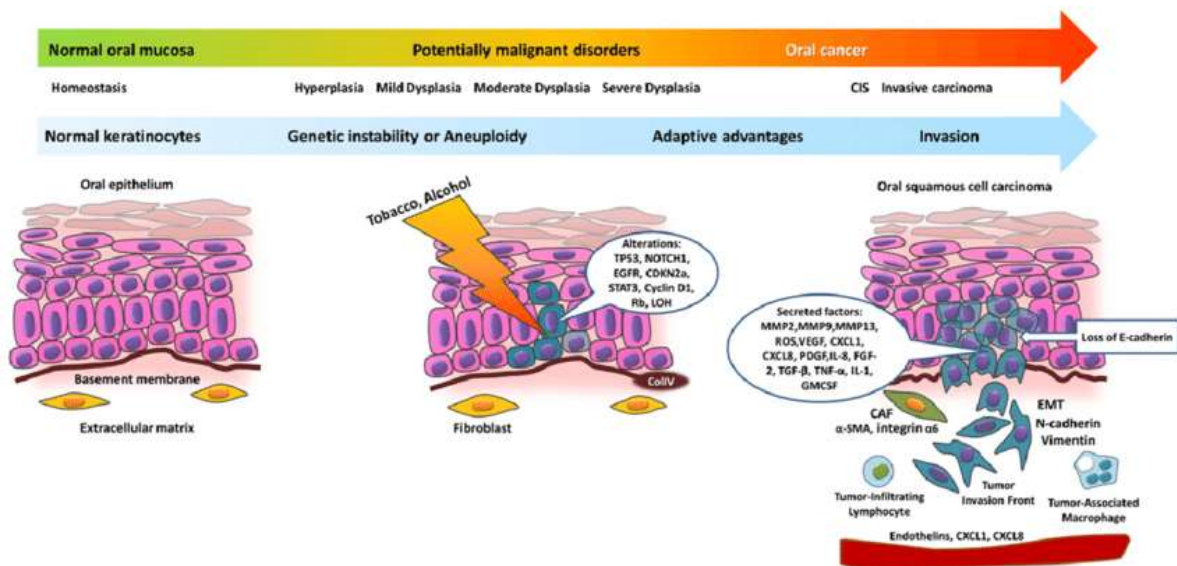
Los diferentes tipos de cáncer oral pueden tener síntomas variables. En etapas tempranas del cáncer, a menudo los pacientes son asintomáticos. En etapas más avanzadas de carcinogenesis, los pacientes pueden presentar dolor significativo, dificultad para masticar, tragar o incluso hablar (Rhodus y Patel, 2014).

## 2.2. DESARROLLO DE COCE

La carcinogénesis oral es un proceso complejo, comienza cuando la mucosa oral normal está expuesta a diferentes factores de riesgo, los cuales alteran la homeostasis generando inestabilidad genética en las células epiteliales (Rivera, 2015).

Los primeros cambios clínicos observables son las lesiones precancerosas, es decir, un tejido morfológicamente alterado, más propenso a desarrollar COCE, como lo son la leucoplasia, caracterizada por lesiones blancas, y la eritroplasia, que se caracteriza por lesiones rojas. A nivel histológico se observan cambios epiteliales como hiperplasia, varios niveles de displasia, hasta llegar a carcinoma in situ y finalmente cáncer (Figura 1) (García y Bascones, 2019; Rivera, 2015).

Durante la carcinogénesis, en las células se dan alteraciones genéticas, que afectan los procesos de reparación del ADN, cambios en el ciclo celular, diferenciación celular y apoptosis. Lo que resulta en células dañadas que heredan estas alteraciones a sus clones. En un proceso más avanzado de carcinogénesis, la proliferación de las células dañadas promueve la invasión y posibilita la metástasis (Figura 1) (Rivera, 2015).



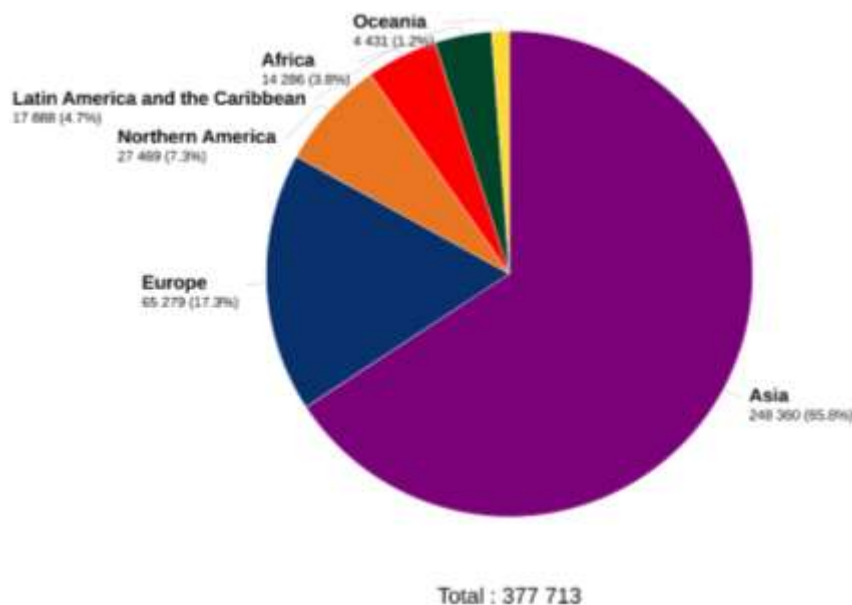
**Figura 1.** Desarrollo del carcinoma de células escamosas de la cavidad oral (Rivera, 2015).

### 2.3. EPIDEMIOLOGIA DEL CÁNCER ORAL

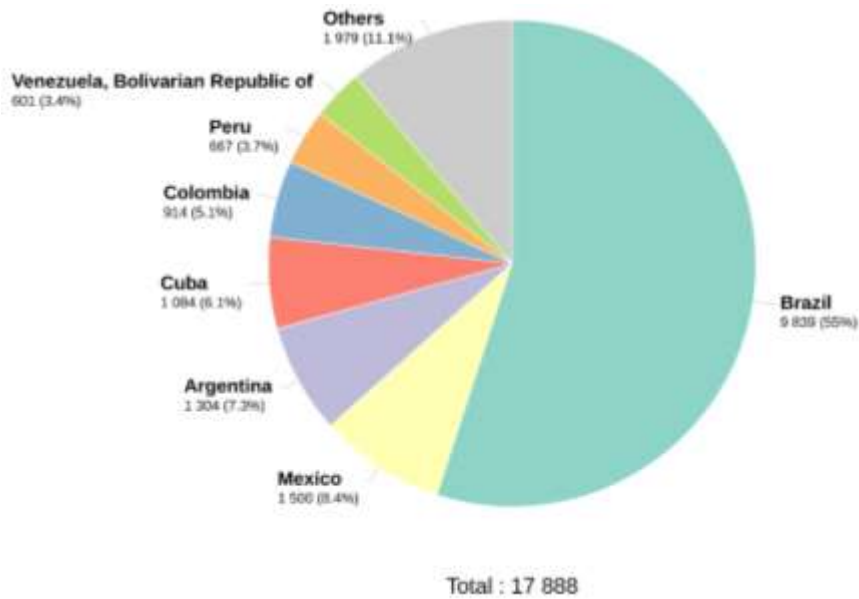
El cáncer es un problema de salud mundial y una de las causas más importantes de mortalidad. En el caso del cáncer oral, junto con la faringe se agrupan en el sexto tipo de cáncer más común en todo el mundo. Los tumores malignos de la cavidad oral representan del 2 al 3% del total de los cánceres, con un total de 377 713 casos nuevos todo el mundo, en 2020 (Figura 2). Sin embargo, su incidencia va a depender del área geográfica, siendo Asia el continente que presenta mayor número de casos en 2020 con 248 360 (Figura 2) (García et al, 2019; Sidrón y Perez, 2015).

En el caso de México, el cáncer oral representa entre el 1 y 5% del total de las neoplasias malignas del país. En el 2020 México presentó un estimado de 1 500 casos nuevos, es el segundo lugar en América Latina, tan solo después de Brasil (Figura 3) (Carrillo et al, 2011).

En cuanto a la edad, el cáncer oral afecta en su mayoría a hombres de entre los 50 y 70 años de edad. Donde los factores principales para el desarrollo del cáncer son el alcohol y el tabaco, el 80% de los pacientes son fumadores y el 50% tienen hábito alcohólico (García et al, 2019).



**Figura 2.** Número estimado de casos nuevos en 2020, labio, cavidad oral, ambos sexos, todas las edades, en el mundo (GLOBOCAN 2020).



**Figura 3.** Número estimado de casos nuevos en 2020, labio, cavidad oral, ambos sexos, todas las edades, en Latinoamérica y el Caribe (GLOBOCAN 2020).

#### 2.4. AUTOFAGIA

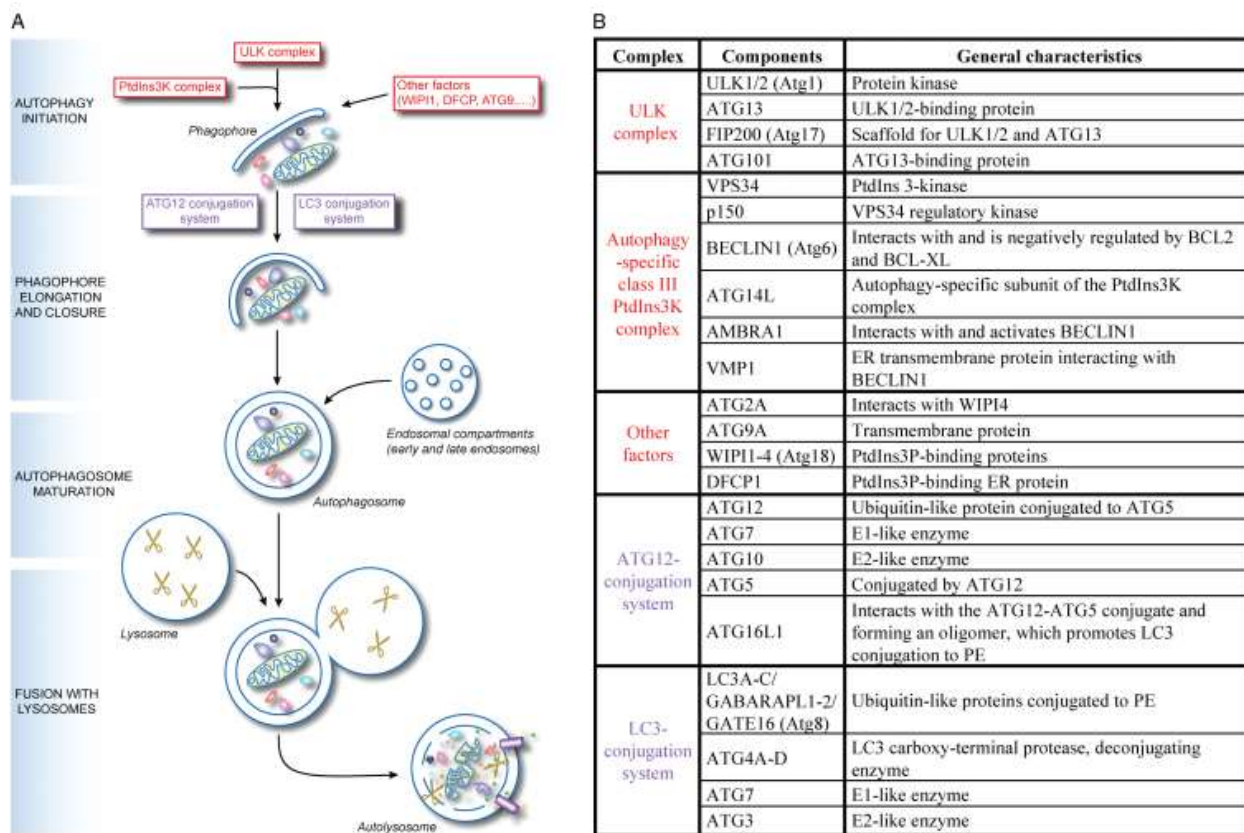
La autofagia (macroautofagia) es un proceso de degradación y reciclaje celular. Se basa en la formación de novo de una vesícula de doble membrana (autofagosoma), que secuestra y transporta las cargas celulares que se van a degradar. El proceso inicia con la formación del fagóforo, este se extiende hasta formar el autofagosoma esférico, después este último se fusiona con un lisosoma (formando un autolisosoma), las hidrolasas lisosomales son las encargadas de degradar los componentes (Figura 4) (Parzych y Klionsky, 2014).

En este proceso participan dieciocho proteínas llamadas ATGs y cinco factores adicionales, agrupados en cinco complejos funcionales en eucariotas superiores. Los complejos que participan son: el complejo de quinasa similar a UNC-51 (ULK), compuesto por el Quinasa ULK1/2, ATG13, FIP200 y ATG101; el complejo PtdIns3K de clase III formado por VPS34, p150, BECLIN1/ATG6, ATG14L, AMBRA1 y VMP1; además interactúan otros factores incluidos ATG2A, ATG9A, DFCP1 y WIPII-4; el sistema de conjugación ATG12, donde participan ATG12, ATG7, ATG10, ATG5 y ATG16L1; y el sistema de conjugación LC3, que incluye a LC3, ATG4, ATG7 y AT3 (Figura 4) (Bestebroer et al, 2013).

La autofagia tiene un papel importante en la carcinogénesis, actúa como un supresor de tumoral. Se encarga de remover organelos y/o proteínas dañadas, limita el crecimiento celular

y la inestabilidad genética, reduce los procesos inflamatorios y/o la necrosis, limita la tolerancia y promueve la inmunovigilancia tumoral. Sin embargo, la autofagia también puede ayudar a la supervivencia de las células tumorales (Peña y Bautista, 2013).

En el caso del COCE, se ha encontrado que la autofagia es un proceso que puede estar involucrado en el desarrollo y progresión de este cáncer. Estudios recientes han descubierto que los biomarcadores de autofagia, LC3B, p62 y Beclin 1 aumentan durante el cáncer oral humano y en la carcinogénesis inducida por 4NQO. Otro estudio encontró una sobreexpresión de la proteína ATG16L1 en lesiones potencialmente malignas y COCE (Nomura et al, 2009; Wu et al, 2018).



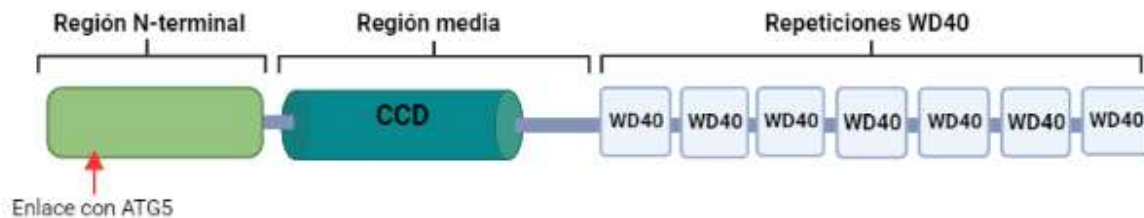
**Figura 4. A) Proceso de autofagia y; B) Proteínas que participan en la autofagia (Bestebroer et al, 2013).**

## 2.5. PROTEÍNA ATG16L1

La proteína ATG16L1 está presente en mamíferos y es el ortólogo de atg16 en levadura. En su estructura, esta proteína cuenta con tres dominios: una región N-terminal, importante para la unión al complejo ATG5-ATG12; una región media con un dominio de bobina enrollada (CCD); y una región C-terminal con 7 repeticiones WD40, las cuales están ausentes en Atg16 (Figura 5) (Gammoh, 2020).

Esta proteína tiene funciones importantes en varias etapas de la autofagia. Entre sus principales funciones: media el reclutamiento de fagóforo del conjugado ATG5-ATG12; ATG16L1 facilita el crecimiento de fagóforos para la nucleación de la membrana del autofagosoma; ATG12-ATG5-ATG16L1 participan como ligasa E3 en la conjugación de PE a LC3-I para crear LC3-II importante para la formación del autofagosoma (Gammoh, 2020).

Por lo tanto, la deficiencia de ATG16L1 interrumpe el reclutamiento del complejo ATG5-ATG12, lo que resulta en una pérdida de LC3. En consecuencia, la formación de autofagosomas y la degradación de proteínas de larga duración son severamente alterados en células deficientes en Atg16L1 (Saitoh, 2008).



**Figura 5.** Organización de los dominios que conforman a la proteína ATG16L1 (Modificado de: Gammoh, 2020).



### **3. JUSTIFICACIÓN**

Existen evidencias recientes que describen una alta expresión de moléculas asociadas a autofagia en muestras de tumores de la cavidad oral, sin embargo, existe poca información sobre la participación de la proteína ATG16L1 en el desarrollo del cáncer oral, el presente trabajo tiene como finalidad evaluar la participación de esta proteína en el proceso de carcinogénesis y en la respuesta inmune de esta enfermedad en un modelo murino.

### **4. HIPÓTESIS**

Ya que se ha sugerido que existe una desregulación de la expresión de la proteína ATG16L1 durante la carcinogénesis oral, la cual podría afectar el comportamiento maligno de las células de carcinoma en células escamosas orales (Nomura et al, 2009), y a que la proteína ATG16L1 es un regulador de la respuesta inflamatoria, se espera que los ratones hipomórficos de la proteína ATG16L1 (ATG16L1HM) presenten mayor carcinogénesis en comparación de los ratones silvestres (WT).

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar cómo la proteína ATG16L1 regula el proceso de carcinogénesis en un modelo murino de cáncer oral.

### 5.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar las diferencias en el peso corporal de ratones WT y ratones ATG16L1<sup>HM</sup>, expuestos a 1- oxido de 4- nitroquinolina (4NQO).
- Identificar diferencias en la evaluación macroscópica, de lengua y paladar, como presencia de leucoplasia y la longitud de las lenguas de ratones WT y ratones ATG16L1<sup>HM</sup>.
- Determinar el daño histológico en cortes de lengua.
- Identificar alteraciones en la saliva, a través del patrón de mucinas.
- Cuantificar el porcentaje de células en sangre por hematocrito.
- Cuantificar la concentración de IL-4 e IL-15 en suero sanguíneo, sobrenadante de cultivo de ganglio cervical y bazo.
- Determinar el porcentaje de linfocitos B en bazo por citometría de flujo

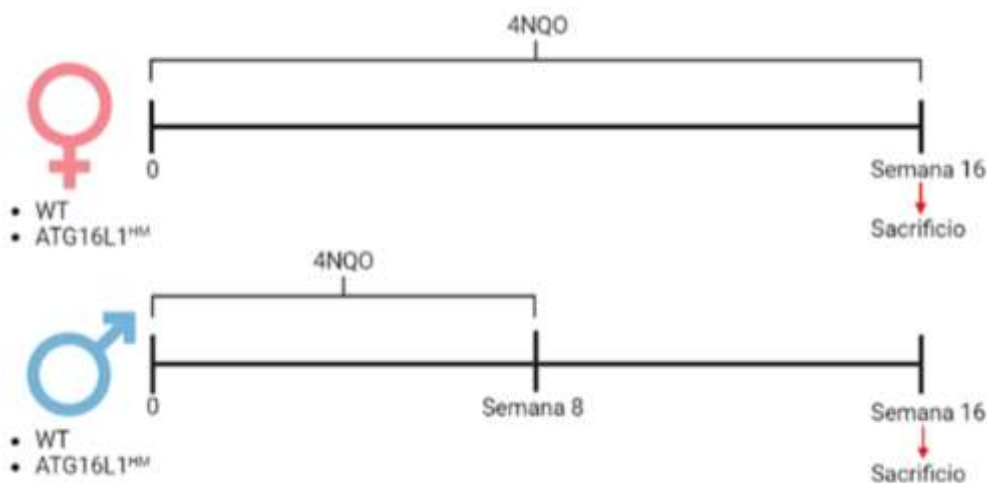
## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. MODELO DE CÁNCER ORAL

Se utilizaron ratones de ambos sexos tanto WT como ATG16L1<sup>HM</sup> con fondo genético C57BL/6 de 8-9 semanas de edad. A las hembras se les indujo cáncer por 16 semanas con 300µl de stock de 4NQO (1- oxido de 4- nitroquinolina) por cada 100ml de agua (4NQO al 0.3%) (Figura 6). Se registró el peso de los ratones durante las 16 semanas.

En el caso de ratones machos, se les indujo cáncer por 8 semanas con 300µl de stock de 4NQO por cada 100ml de agua (4NQO al 0.3%) (Figura 6). Se registró el peso de los ratones durante 16 semanas.

A la semana 16 de ambos grupos, se obtuvieron muestras de sangre de cada uno de los ratones, se utilizó para hematocrito y se centrifugaron a 3000 rpm por 5 minutos para obtener suero sanguíneo posteriormente utilizados en ELISA. Se eutanizaron para la extracción de ganglio cervical, bazo, paladar y lengua (de esta última se midió la longitud).



**Figura 6.** Protocolo de administración de 4NQO a ratones hembras y machos.

### 6.2. HISTOLOGÍA DE LENGUAS

Las muestras de lengua se mantuvieron 24 hrs en formaldehído al 4%, posterior a ese tiempo se realizó el tren de deshidratación e inclusión (Anexo 1). Con las lenguas incluidas en parafina, se realizaron cortes longitudinales, con un grosor de 5 µm. Los cortes se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) (Anexo 2).

### 6.3. PATRÓN DE MUCINAS EN SALIVA

Se obtuvo una gota de saliva con pipeta Pasteur de cada uno de los ratones, la gota se colocó en un portaobjetos y se dejó secar, posteriormente se observaron al microscopio con la finalidad de identificar cambios estructurales en el patrón de mucinas.

### 6.4. HEMATOCRITO

Se obtuvieron muestras de sangre, cada muestra se le agregó 40µl de EDTA al 1%, como anticoagulante. La sangre se recolectó por medio de un capilar hasta un 80% de la capacidad. Se sellaron ambas esquinas del capilar y se dejó reposar por 24hrs. Se obtuvo el porcentaje del contenido del paquete celular al dividir este entre el total de la muestra y multiplicarlo por 100.

### 6.5. CULTIVO CELULAR DE BAZO Y GANGLIO CERVICAL

Se maceraron los ganglios y bazo de cada grupo de ratones, y se diluyeron en 1 ml de medio RPMI1640 suplementado con SFB (10%) y antibiótico (estreptomicina, 10 µg/ml). La suspensión celular obtenida se colocó en tubos de 15 ml. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 3000 rpm por 6 minutos. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió en medio nuevo. Se tomó una muestra de 10 µl de cada muestra para conteo celular en cámara de Neubauer y se contabilizaron únicamente las células vivas por medio de exclusión con azul tripano.

Se sembraron 3 x10<sup>6</sup>/ml (ganglio) y 5x10<sup>6</sup>/ml (bazo), donde se organizaron grupos sin estímulo y grupos que se estimularon con concanavalina A. Se incubaron a 37°C por 48 horas. Después de ese tiempo, 1ml de las muestras se pasaron a tubos eppendorf, se centrifugó en frío para obtener 900 µl de sobrenadante posteriormente fueron utilizados para ELISA.

### 6.6. ELISA

Se diluyó el anticuerpo de captura con PBS a una concentración 1 µg/ml, se agregó 100 µl a cada pozo de la placa, se cubrió la placa y dejó a 4°C toda la noche. Se desechó y lavó la placa con PBS-Tween (0.05%) y se secó.

Se colocaron 300  $\mu$ l en cada pozo de solución de bloqueo (PBS-BSA 1%) y se incubó 1 hora a 37°C. Se colocaron 50  $\mu$ l de sobrenadante correspondientes a las muestras de células totales de ganglio y bazo y 25  $\mu$ l de suero sanguíneo + 25  $\mu$ l de PBS-BSA en los pozos correspondientes, para la curva se agregó 200  $\mu$ l de citocina recombinante (pozo 1A) del pozo 2A- 12A se agregó 100  $\mu$ l PBS-BSA y se diluyó para obtener la curva. Se taparon las placas y dejaron toda la noche a 4°C.

La placa se lavó, seco y se agregó a cada pozo 100  $\mu$ l de PBS-BSA y anticuerpo de detección (a una concentración 0.5  $\mu$ g/ml). Se dejó 1 hora a 37°C, se volvieron a lavar y secar. Se agregó a cada pozo 100  $\mu$ l de PBS/BSA y enzima HRP, se tapó la placa y se dejó a temperatura ambiente por 45 minutos. Se colocaron en cada pozo 100  $\mu$ l de dilución de peróxido de hidrogeno y ABTS. Para finalizar se leyó la placa en espectrofotómetro a 450 nm.

#### 6.7. CITOMETRÍA DE FLUJO

Para ello se utilizaron las muestras de células bazo con medio, los cuales se centrifugaron por 6 min a 3000 rpm y se resuspendieron las muestras en 3ml de ACK por 3min. Se agregó 3ml de medio, centrifugo, decanto y resuspendió en 5ml de medio.

Se extrajeron 500ml de células. Se adiciono 500  $\mu$ l de Fac's en tubos Fac's (o eppendorf), para posteriormente centrifugar y decantar. Esto nuevamente se resuspendió en 200  $\mu$ l de buffer de Fac's y se agregó suero vacuno y los siguientes anticuerpos: C19+PE, CD3+AP Cy7, PDL1, PDL 2 y 7AAD. Se incubaron 40 min a 4°C. Pasado ese tiempo, se agregaron 500  $\mu$ l de buffer Fac's, las muestras fueron centrifugadas, para decantar y resuspender en buffer y nuevamente centrifugar y decantar. Por último, se agregó 300 $\mu$ l de Fac's y 100 $\mu$ l PFA 4%. Las muestras se analizaron por citometría de flujo.

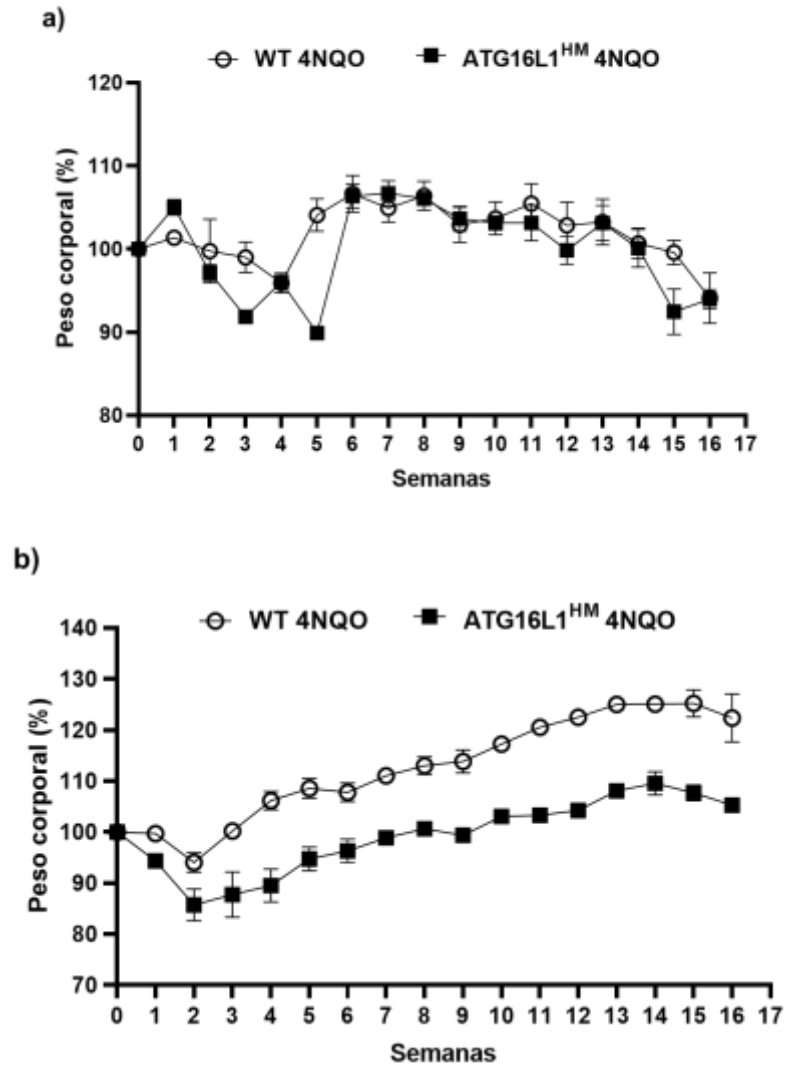
#### 6.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para determinar si las diferencias observadas en los distintos parámetros evaluados eran estadísticamente significativas, se realizó una prueba de *t* no pareada. En dichas comparaciones, un valor de *p* <0.05 se aceptó como estadísticamente significativo. El análisis se llevó a cabo con el programa Graph pad Prism versión 9.1.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. PESO CORPORAL

Ratones de ambos sexos a los cuales se les indujo COCE experimental como se indica en la sección de materiales y métodos, fueron monitoreados semanalmente para determinar cambios en el peso corporal. La grafica 1 presenta el cambio en el porcentaje de peso corporal, comparado con el peso inicial, en ratones WT y ratones ATG16L1<sup>HM</sup> tratados con 4NQO durante 16 semanas. En el caso de las hembras (panel a), no presentaron diferencias significativas entre ambos grupos, pero se observa una baja de peso en el grupo ATG16L1<sup>HM</sup> en la semana 3 a la 5, seguida de un tiempo de recuperación, posteriormente ambos grupos tuvieron una baja de peso en la semana 16, comparada con la semana 0. Mientras que en el caso de los ratones machos (panel b) el grupo ATG16L1<sup>HM</sup> observamos un peso corporal significativamente menor, desde la semana 2 hasta el día de sacrificio en la semana 16, esto comparado con el grupo de ratones WT.

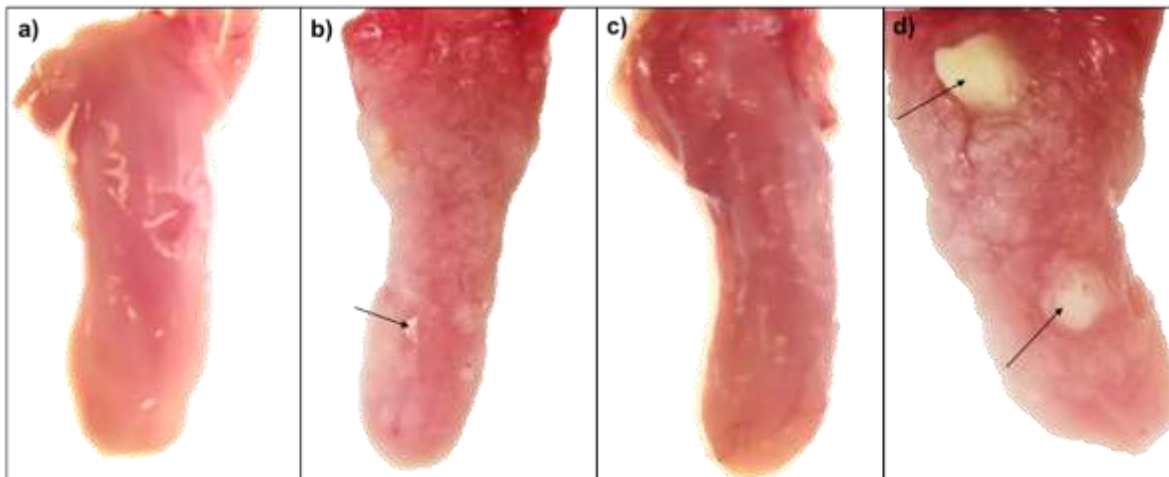


**Grafica 1.** Porcentaje de peso corporal de ratones WT y ATG16L1<sup>HM</sup> tratados con 4NQO. Los datos mostrados son obtenidos de un experimento con n=4 para cada sexo.

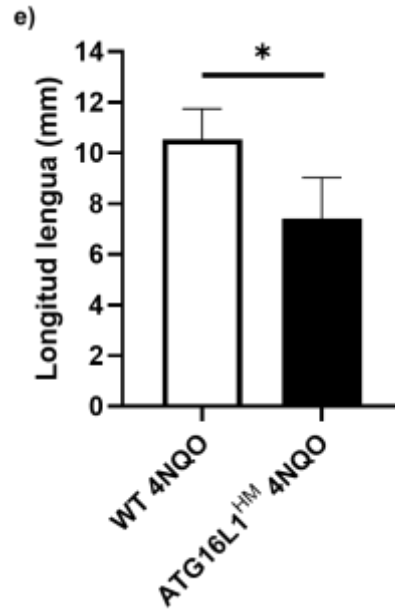
## 7.2. ANÁLISIS MACROSCÓPICO DE LA LENGUA Y PALADAR

La inducción de COCE experimental genera cambios macroscópicos, así como alteraciones histopatológicas en los diferentes tejidos de la cavidad oral. Los parámetros que se utilizan para realizar una descripción de cambios macroscópicos incluyen lesiones precancerosas como leucopasia o eritroplasia, longitud de la lengua y la apariencia del paladar. En este estudio se analizaron estos parámetros en los diferentes grupos experimentales.

En el caso de las hembras, se observa que los ratones WT control no presentan ningún tipo de lesión (figura 7a), mientras que en los ratones hembra WT 4NQO se observan regiones engrosadas de color blanco (leucoplasia) y un pequeño tumor (figura 7b). Los ratones hembra ATG16L1<sup>HM</sup> control no presentaron ninguna lesión visible (figura 7c), sin embargo, en los ratones ATG16L1<sup>HM</sup> 4NQO son evidentes tumores de mayor tamaño (figura 7d). En cuanto a la longitud de la lengua (grafica 7e), la prueba de t no pareada arrojó un resultado de  $p < 0.05$  (representado con un \*) por lo que estadísticamente, hay diferencias significativas entre los ratones a los que se les indujo COCE del grupo WT comparado con la longitud de la lengua de los ratones ATG16L1.

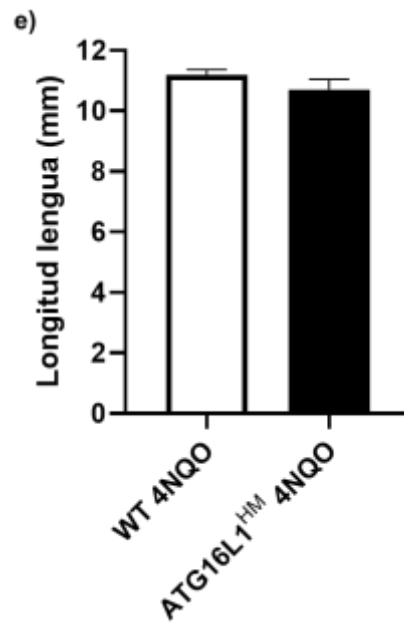
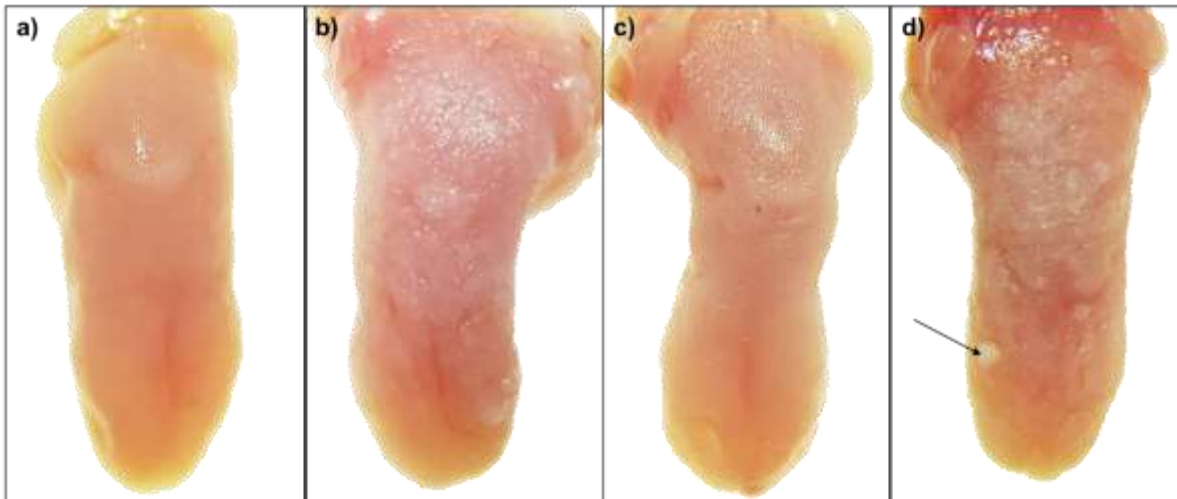






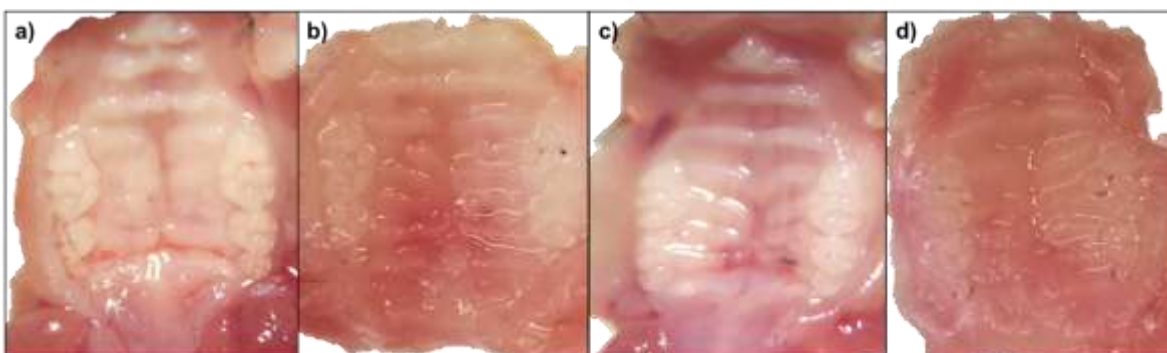
**Figura 7.** Imágenes representativas de lengua de ratones hembra (experimento de  $n=4$ ), después de 16 semanas de inducción al cáncer con 4NQO. **a)** WT Control; **b)** WT con 4NQO; **c)** ATG16L1<sup>HM</sup> control; **d)** ATG16L1<sup>HM</sup> con 4NQO. (Las flechas indican formación de tumores); **e)** grafica longitud de lenguas en hembras tratadas con 4NQO ( $*p<0.05$ ).

De igual manera, observamos que en el caso de los machos los ratones ATG16L1<sup>HM</sup> son más susceptibles comparados con ratones machos WT, esto a pesar de recibir el reactivo 4NQO solamente la mitad del tiempo que las hembras. En la figura 8 podemos observar que no fue evidente alguna alteración en los individuos que recibieron agua sin 4NQO (control) tanto WT y ATG16L1<sup>HM</sup>, podemos ver las imágenes representativas de la figura 8a y 8c, respectivamente. Cuando se administró el agente carcinogénico 4NQO en los ratones WT, se observó únicamente lesiones compatibles con leucoplasia (ver figura 8b), mientras que los ratones ATG16L1<sup>HM</sup> presentaron además de leucoplasia formaciones tumorales (figura 8d). En las longitudes de las lenguas (Grafica 8e) no se observó ninguna diferencia significativa en la longitud de la lengua de los grupos experimentales ( $p>0.05$ ).



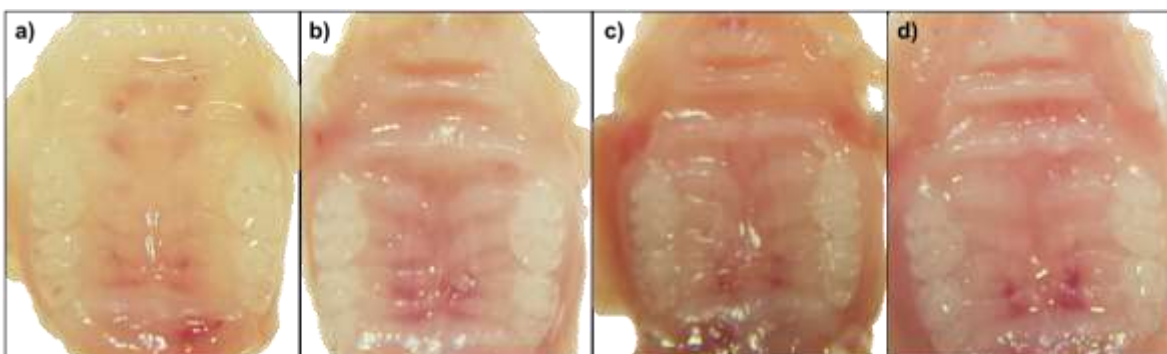
**Figura 8.** Imágenes representativas (experimento de  $n=4$ ) de lengua de ratones machos, después de 8 semanas de inducción al cáncer con 4NQO y sacrificados a la semana 16. **a)** WT Control; **b)** WT con 4NQO; **c)** ATG16L1<sup>HM</sup> control; **d)** ATG16L1<sup>HM</sup> con 4NQO (la flecha indica formación tumoral); **e)** grafica longitud de lenguas en machos tratados con 4NQO ( $p>0.05$ ).

De manera adicional, se realizó un análisis visual de las maxilares obtenidas de los grupos experimentales. En el caso de las hembras, no se observan diferencias significativas en los grupos tratados con 4NQO (figura 9b y 9d) comparados con los grupos controles (figura 9a y 9c), a pesar de recibir el tratamiento durante las 16 semanas, sin embargo, habrá que hacer un análisis histológico para determinar el daño a nivel celular)



**Figura 9.** Cortes representativos de paladar de ratones hembras (experimento de  $n=4$ ), después de 16 semanas de inducción con 4NQO y sacrificados a la semana 16. **a)** WT Control; **b)** WT con 4NQO; **c)** ATG16L1<sup>HM</sup> control; **d)** ATG16L1<sup>HM</sup> con 4NQO.

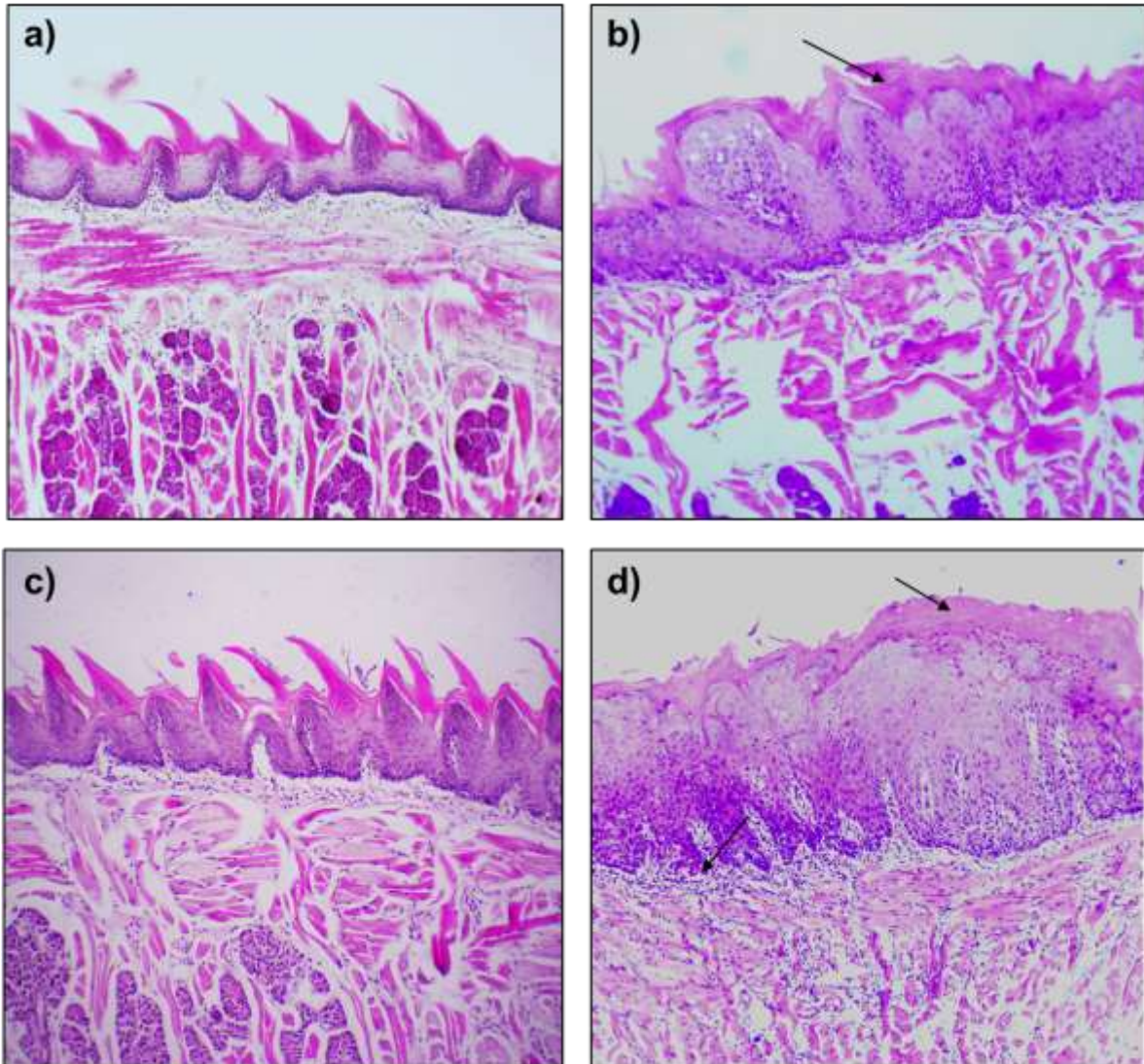
De la misma forma, al observar los paladares de los machos tratados con 4NQO, tanto WT como ATG16L1<sup>HM</sup> (figura 10b y 10d) solo por 8 semanas, no presentaron diferencias significativas en comparación con los grupos controles (figura 10a y 10c) (de igual manera no se sabe si hay daño celular).



**Figura 10.** Cortes representativos de paladar de ratones machos (experimento de  $n=4$ ), después de 8 semanas de inducción con 4NQO y sacrificados a la semana 16. **a)** WT Control; **b)** WT con 4NQO; **c)** ATG16L1<sup>HM</sup> control; **d)** ATG16L1<sup>HM</sup> con 4NQO.

### 7.3. DAÑO HISTOPATOLÓGICO

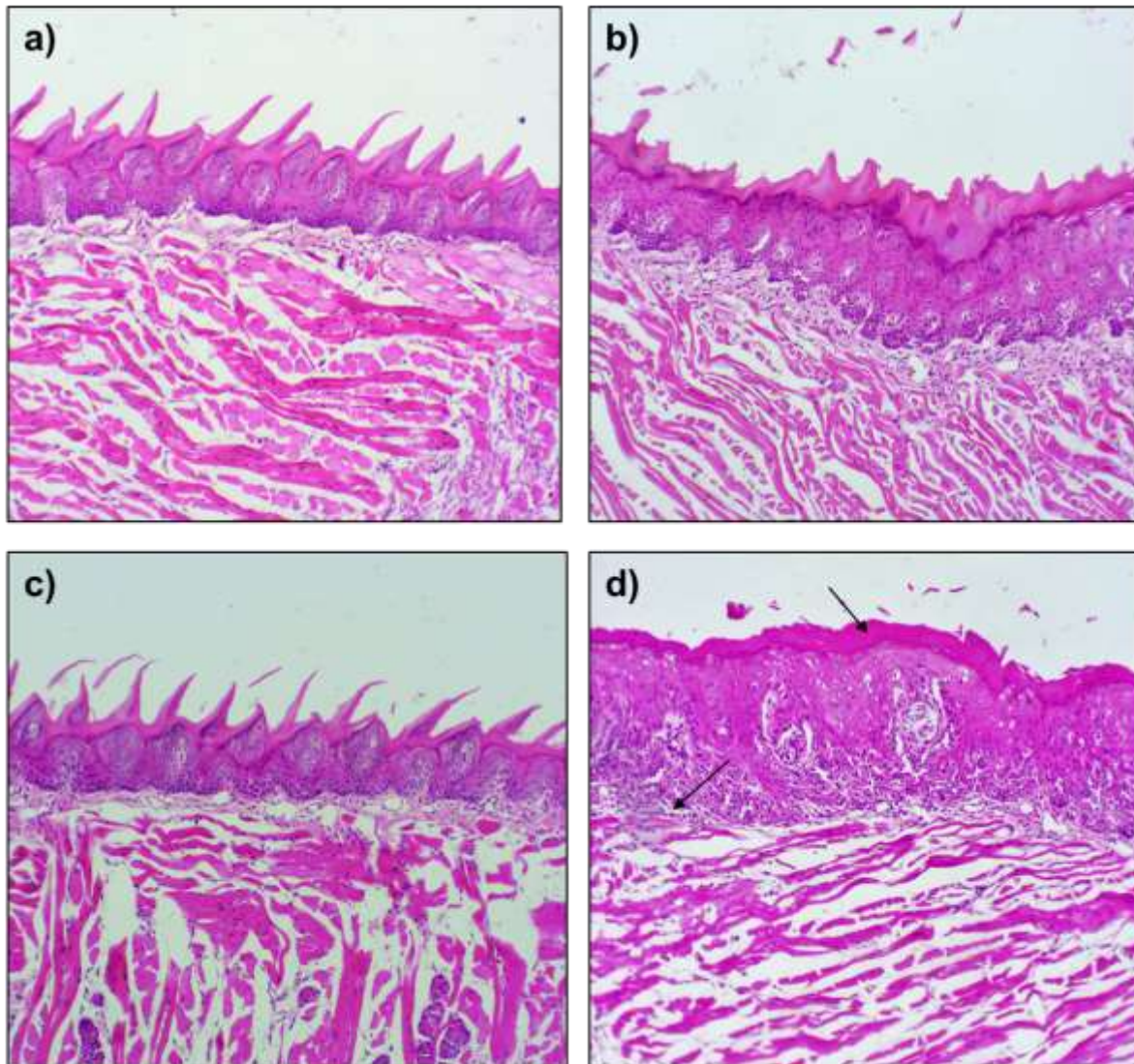
Determinar el daño histopatológico causado por el 4NQO, permite establecer en qué etapa se encuentra la enfermedad (hiperplasia, displasia, cáncer in situ o COCE). En el caso de las hembras, en los grupos control tanto WT como ATG16L1<sup>HM</sup> (panel 11a y 11c) se observa un epitelio sano, se observan las papilas filiformes y el epitelio plano estratificado queratinizado. En ratones hembra WT 4NQO (panel 11b) se observa que el epitelio comienza a desarrollar displasia en el dorso de la lengua. Sin embargo, los cambios morfológicos y estructurales en las células del epitelio son más notorios en el grupo experimental ATG16L1<sup>HM</sup> (panel 11d), donde podemos observar un epitelio hiperqueratinizado, donde se pierden las estructuras de las papilas, mayor displasia y la membrana basal se comienza a perder.



**Figura 11.** Cortes longitudinales representativos de lengua de ratones hembras (experimento de  $n=4$ ), con tinción hematoxilina y eosina (H&E) a un aumento a 10x. **a)** WT sano; **b)** WT con 4NQO; **c)** ATG16L1<sup>HM</sup> sano; **d)** ATG16L1<sup>HM</sup> con 4NQO (las flechas indican epitelio hiperqueratinizado y pérdida de la membrana basal).

En los machos, en los grupos control tanto WT como ATG16L1<sup>HM</sup> (panel 12a y 12c), nuevamente se observa epitelios sanos. Los grupos experimentales, a pesar de recibir la mitad del tratamiento en comparación con las hembras, si presentaron cambios histológicos. El grupo WT 4NQO en machos (panel 12b) se puede observar aun la presencia de papilas, pero ya hay displasia. Nuevamente el grupo ATG16L1<sup>HM</sup> 4NQO en machos (panel 12d) presenta

mayores cambios, se observa una capa hiperqueratinizada donde deberían estar las papilas, displasia y la membrana basal comienza a perderse.

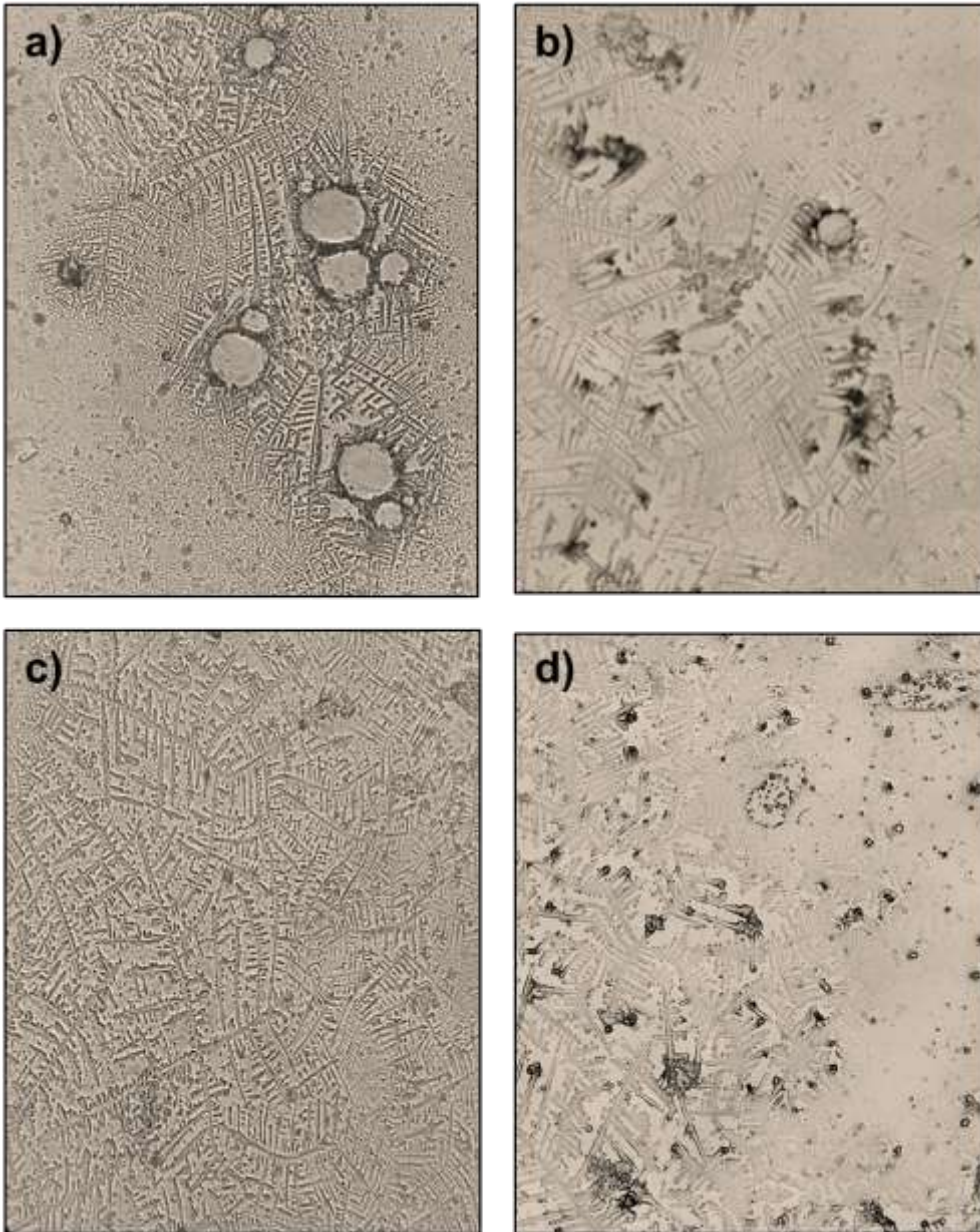


**Figura 12.** Cortes longitudinales representativos (experimento de  $n=4$ ) de lengua de ratones machos, con tinción hematoxilina y eosina (H&E) a un aumento a 10x. **a)** WT sano; **b)** WT con 4NQO; **c)** ATG16L1<sup>HM</sup> sano; **d)** ATG16L1<sup>HM</sup> con 4NQO (las flechas indican epitelio hiperqueratinizado y pérdida de la membrana basal).

#### 7.4. PATRÓN DE MUCINAS EN SALIVA

Cuando la saliva se seca, produce un patrón cristalizado en forma de helecho, por la presencia de mucinas. Es por ellos, que para determinar el daño causado por el 4NQO a la saliva de los ratones se utilizó la prueba de Ferning y se clasificó de acuerdo al criterio de Ronaldo, esto permite clasificar el patrón de helecho formado por la saliva en 4 categorías, tipos I, II, III y IV, donde I y II se consideran sanos y III y IV se consideran anormales.

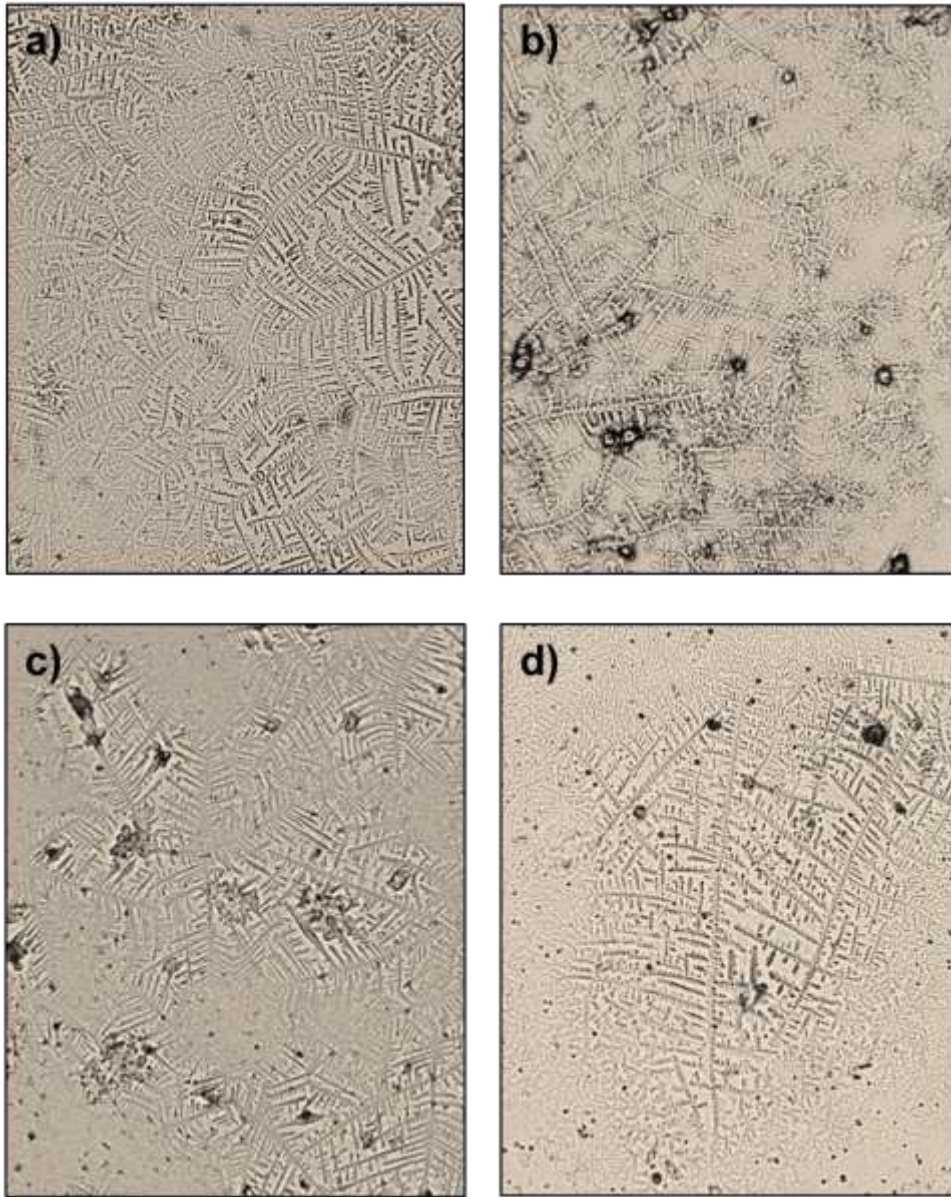
El patrón de mucinas salivales en hembras WT sanas y ATG16L1<sup>HM</sup> sanas (ver panel 13a y 13c) son de tipo II, donde se siguen observando formas de helechos, pero hay más espacio entre las ramas. En el caso de las hembras WT 4NQO es de tipo II- III (ver panel 13b), donde en el tipo III los helechos son más pequeños, formados de forma incompleta, se observan pocas ramificaciones y más espacio entre ellos. Para el grupo ATG16L1<sup>HM</sup> 4NQO, la clasificación es de tipo III (ver panel 13d).



**Figura 13.** Muestras salivales de ratones hembras, tomadas a la semana 16, vistas a un aumento a 10x. **a)** WT sano; **b)** WT con 4NQO; **c)** ATG16L1<sup>HM</sup> sano; **d)** ATG16L1<sup>HM</sup> con 4NQO (experimento de n=4).



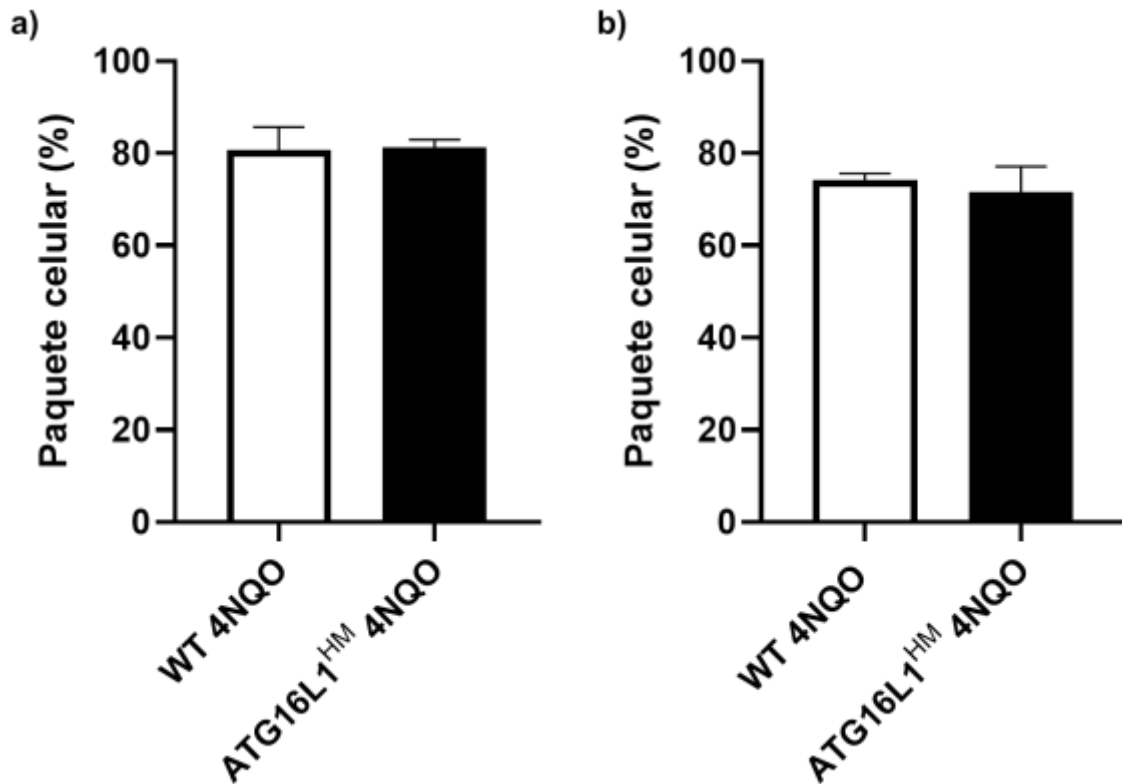
En el caso de los machos, de igual manera los grupos sanos WT y ATG16L1<sup>HM</sup> presentaron un patrón de mucinas tipo I-II (ver panel 14a y 14c). Mientras que los grupos WT 4NQO y ATG16L1<sup>HM</sup> 4NQO, presentaron un patrón tipo II-III, debido a que comienzan a aparecer grandes espacios entre helechos y pocas ramificaciones (panel 14b y 14d).



**Figura 14.** Muestras salivales de ratones machos, tomadas a la semana 16, vistas a un aumento a 10x. **a)** WT sano; **b)** WT con 4NQO; **c)** ATG16L1<sup>HM</sup> sano; **d)** ATG16L1<sup>HM</sup> con 4NQO (experimento de n=4).

### 7.5. HEMATOCRITO

Con la finalidad de medir la cantidad de eritrocitos presentes en sangre como respuesta al tratamiento con 4NQO, se realizó la medición del hematocrito a las 16 semanas. El porcentaje del paquete celular en sangre de los grupos WT 4NQO y ATG16L1<sup>HM</sup> de hembras (grafica 2a) no presentaron diferencias significativas uno respecto del otro ( $p>0.05$ ). Los machos, tampoco presentaron diferencias significativas en el porcentaje de glóbulos rojos en los grupos WT 4NQO y ATG16L1<sup>HM</sup> 4NQO ( $p>0.05$ ) (grafica 2b).

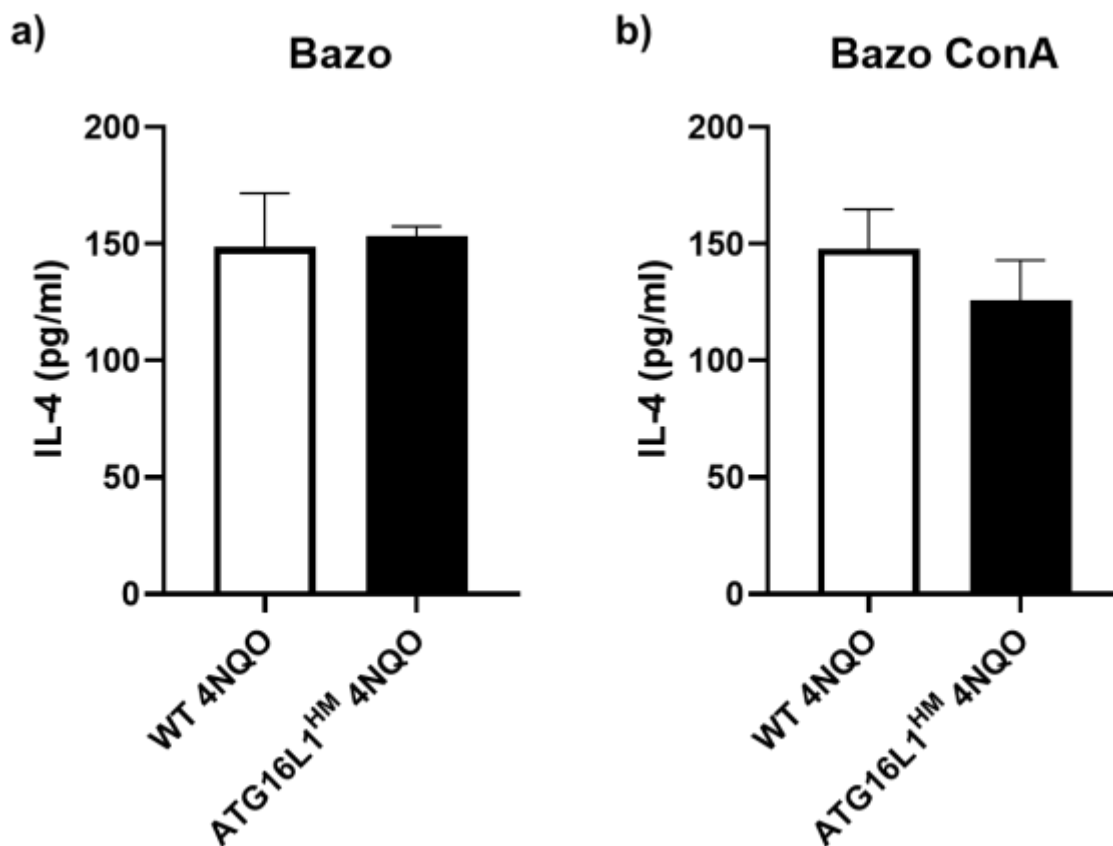


**Grafica 2.** Hematocrito de ratones tratados con 4NQO, obtenido a las 16 semanas. **a)** Hembras ( $p>0.05$ ); **b)** Machos( $p>0.05$ ) (datos obtenidos de un experimento de  $n=4$  para ambos sexos).

### 7.6. ELISA

Debido a que IL-4 está asociada a la progresión de varios tipos de carcinomas, esta se cuantificó en órganos linfoides secundarios de ratones hembras que fueron inducidos a COCE con 4NQO. Donde se observa que, en el cultivo de células totales de bazo, hay mayor concentración de IL-4 en el grupo ATG16L1<sup>HM</sup> 4NQO, en comparación con el grupo WT

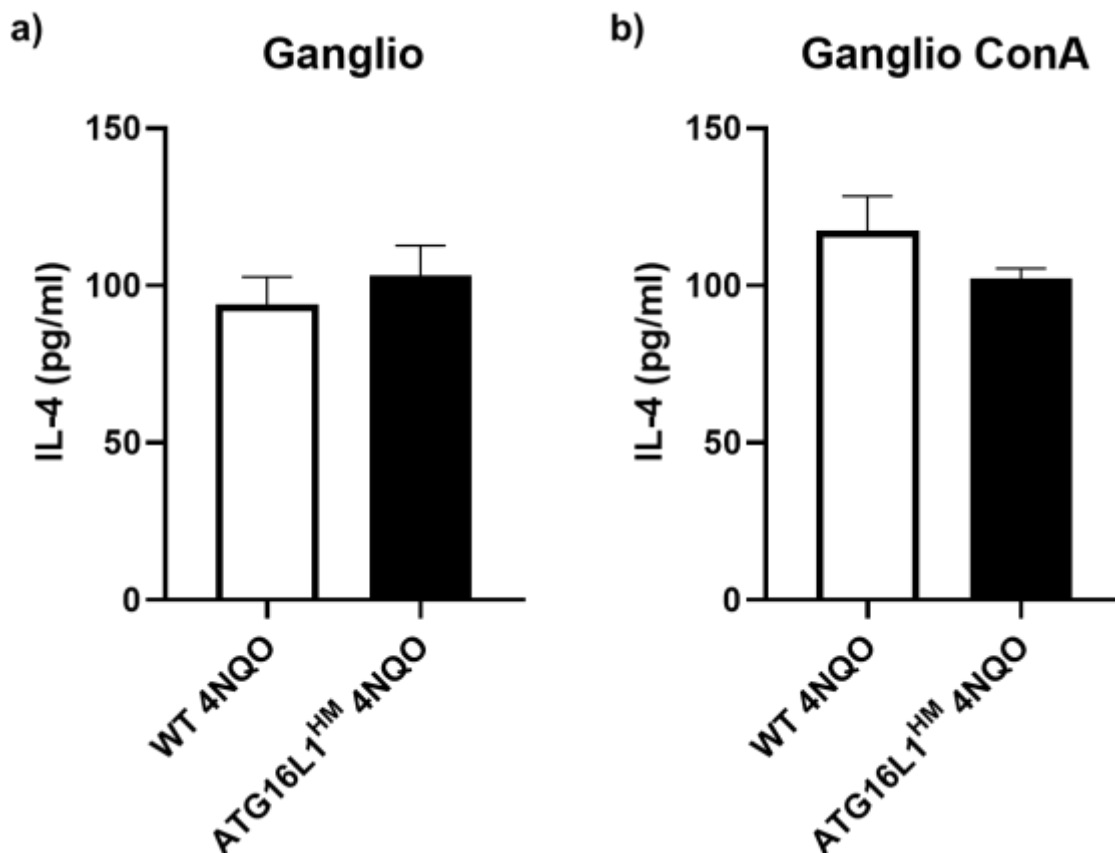
4NQO (ver grafica 3a). Al ser estimulados con concanavalina A , hay mayor concentración de IL-4 en el grupo WT 4NQO que en ATG16L1<sup>HM</sup> con 4NQO (Grafica 3b). Sin embargo, la prueba de t no pareada no encontró diferencias significativas en ninguno de los casos ( $p>0.05$ ).



**Grafica 3.** Concentración de interleucina -4 (IL-4) (pg/ml) en ratones hembras WT y ATG16L1<sup>HM</sup> con 4NQO (datos de un experimento de  $n=4$ ). **a)** Células totales de bazo ( $>0.05$ ); **b)** Células totales de bazo estimuladas con concanavalina A ( $>0.05$ ).

De igual manera, la concentración IL-4 fue mayor en ratones hembras del grupo ATG16L1<sup>HM</sup> 4NQO en comparación con el grupo WT 4NQO de hembras, en células de ganglio cervical no estimulado (ver grafica 4a). Al estimular las células de ganglio cervical con concanavalina A, la presencia de IL-4 es mayor en el grupo WT 4NQO que en ATG16L1<sup>HM</sup> (ver grafica 4b). La prueba de t no encontro diferencias significativas en ganglio cervical no estimulado y estimulado con concanavalina A ( $>0.05$ ).

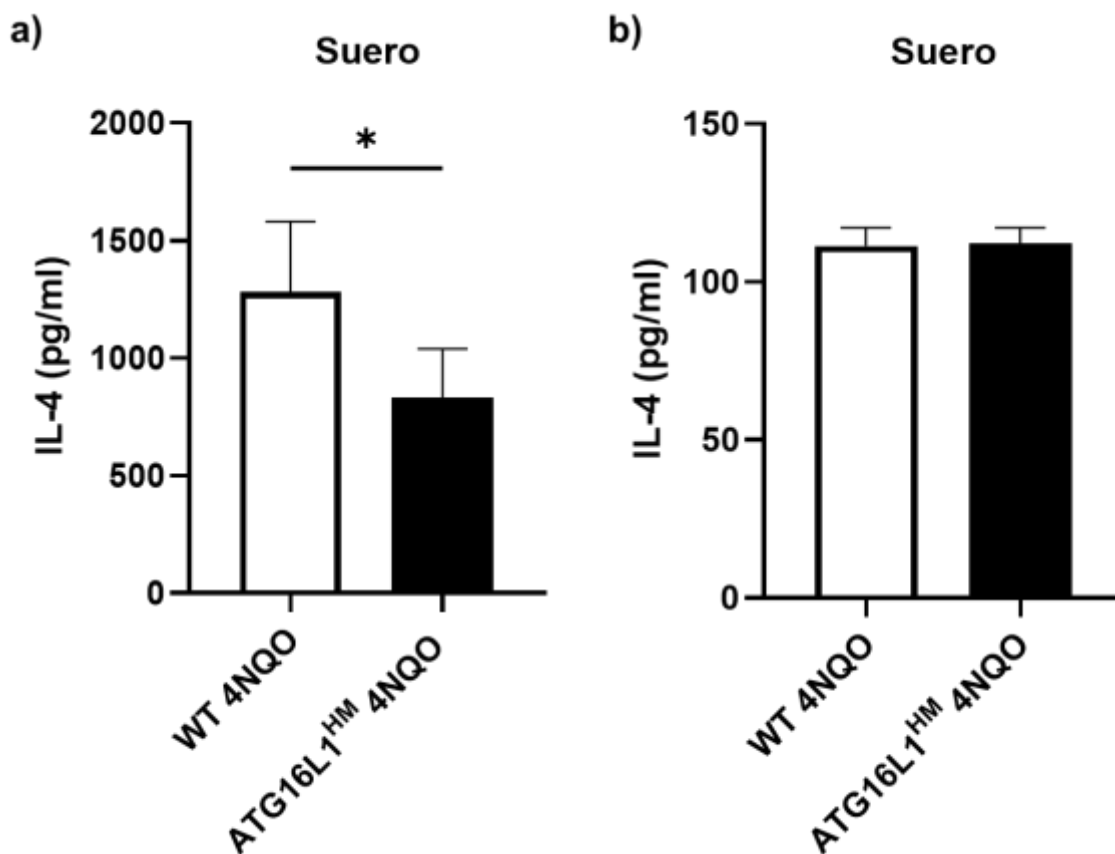
De igual manera, la concentración IL-4 fue mayor en ratones hembra del grupo ATG16L1<sup>HM</sup> 4NQO en comparación con el grupo de hembras WT 4NQO, en el cultivo de células totales de ganglio cervical no estimulado (ver grafica 4a). Al estimular las células totales de ganglio cervical con Concanavalina A, la presencia de IL-4 es mayor en el grupo WT 4NQO que en ATG16L1<sup>HM</sup> (ver grafica 4b). La prueba de t no encontró diferencias significativas en ganglio cervical no estimulado y estimulado con concanavalina A ( $p > 0.05$ ).



**Grafica 4.** Concentración de interleucina -4 (IL-4) (pg/ml) en ratones hembras WT Y ATG16L1<sup>HM</sup> con 4NQO (datos de un experimento de  $n=4$ ). **a)** Células totales de ganglio cervical ( $p > 0.05$ ); **b)** Células totales de ganglio cervical estimuladas con concanavalina A ( $p > 0.05$ ).

Con el fin de comparar la respuesta al tratamiento con 4NQO en hembras y en machos, también se obtuvo la concentración de IL-4 en suero sanguíneo a las 16 semanas en ambos sexos. En el caso de las hembras, la concentración de IL-4 del grupo WT 4NQO es significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) que en el grupo ATG16L1<sup>HM</sup> 4NQO (ver grafica 5a). En

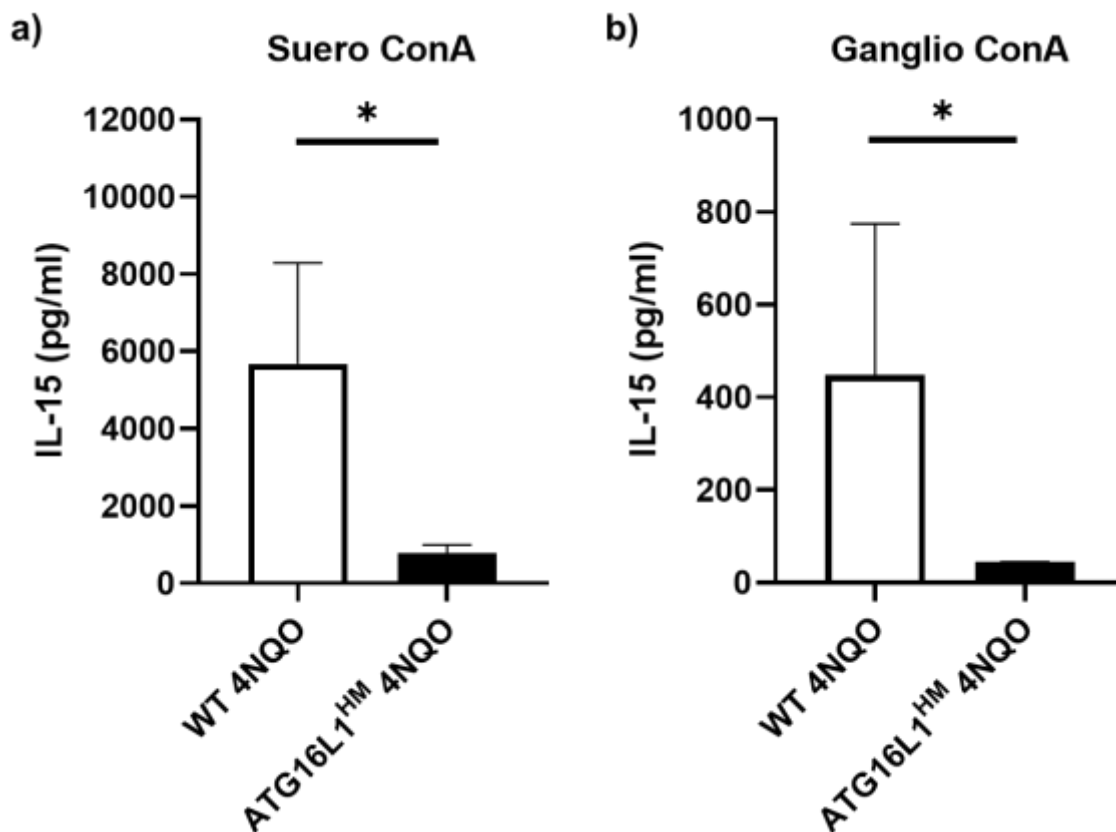
los machos no hay diferencias significativas en la concentración de IL-4 entre ambos grupos ( $p>0.05$ ) (ver grafica 5b).



**Grafica 5.** Concentración de interleucina -4 (IL-4) (pg/ml) en grupos WT y ATG16L1<sup>HM</sup> tratados con 4NQO. **a)** Suero sanguíneo de hembras a las 16 semanas ( $*p<0.05$ ); **b)** Suero sanguíneo de machos a las 16 semanas ( $p>0.05$ ) (datos de un experimento de  $n=4$  para ambos sexos).

De manera adicional, se cuantifico la concentración de IL-15 por ELISA, solo en suero sanguíneo y cultivo de células totales de ganglio cervical de ratones hembra, estimulados con concanavalina A. En el caso del suero sanguíneo, se observa una mayor concentración de IL-15 en WT 4NQO que en ATG16L1<sup>HM</sup> 4NQO (ver grafica 6a). En el caso del ganglio cervical, sucedió lo mismo, se encontró más concentración de IL-15 en WT 4NQO en comparación con el grupo ATG16L1<sup>HM</sup> 4NQO (ver grafica 6b). Al realizar la

prueba de t tanto en suero sanguíneo como en ganglio cervical, se encontraron diferencias significativas en la concentración IL-15 en ambos grupos experimentales ( $p < 0.05$ ).

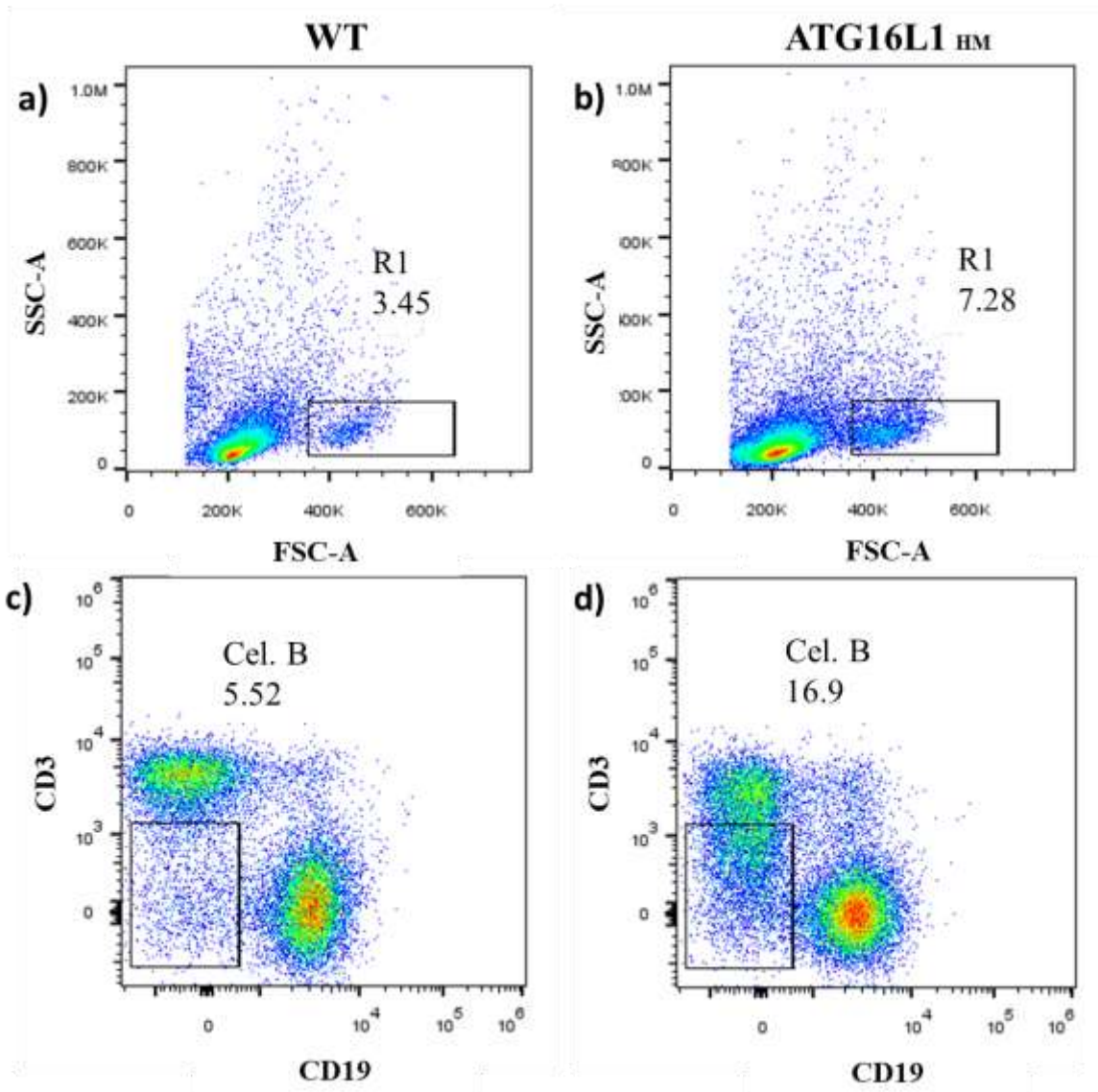


**Grafica 6.** Concentración de interleucina -15 (IL-15) en grupos de ratones hembras tanto WT y ATG16L1<sup>HM</sup> tratados con 4NQO (datos de un experimento de  $n=4$ ). a) Suero sanguíneo ( $*p < 0.05$ ); b) Células totales de ganglio cervical ( $*p < 0.05$ ).

### 7.7. CITOMETRÍA DE FLUJO

Debido a que los linfocitos tienen un papel importante en la respuesta inmunitaria contra el cáncer, se decidió cuantificar el porcentaje de estos en bazo de ratones hembra inducidos a COCE experimental, por medio de la citometría de flujo. Como se puede observar en la gráfica 7a y 7b, hay mayor porcentaje de linfocitos en el grupo ATG16L1<sup>HM</sup> 4NQO en comparación con el grupo WT 4NQO, de acuerdo con lo observado en los paneles, se observa la presencia de otro grupo células, sin embargo, habría que hacer un análisis para determinar de qué población se trata. Por otro lado, se determinó que porcentaje de células

corresponde a linfocitos B, donde hubo mayor porcentaje de estos en el grupo  $ATG16L1^{HM}$  4NQO (grafica 7d), que en el grupo WT 4NQO (grafica 7c).



**Grafica 7.** Citometría de flujo en bazo de ratones hembras ( $n=4$ ). **a)** Porcentaje de linfocitos en WT 4NQO; **b)** Porcentaje de linfocitos en  $ATG16L1^{HM}$  4NQO; **c)** Porcentaje de Células B en WT 4NQO; **d)** Porcentaje de células B en  $ATG16L1^{HM}$  4NQO.

## 8. DISCUSIÓN

La autofagia, puede considerarse un proceso complejo en presencia de cáncer, no es claro el papel que juega en esta enfermedad, debido a que todas las células nucleadas realizan este proceso. Se ha sugerido que la autofagia tiene una función antitumoral, pero una vez establecida la neoplasia, ocurren cambios adaptativos, que ayudan a la progresión del tumor. Se ha encontrado que la deficiencia de proteínas clave en el proceso de autofagia, han sido implicadas en la patofisiología del cáncer, en donde al disminuir la actividad autofagica contribuye al mayor crecimiento y resistencia de células tumorales (Peña y Bautista, 2013).

Sin embargo, otros estudios sugieren que la autofagia se asocia con la progresión y el mal pronóstico del COCE. Se ha encontrado en el caso de la proteína ATG16L1, se ha reportado inmunoreactividad baja en muestras de mucosa oral normal, mientras que existe una sobreexpresión de ATG16L1 en lesiones precancerosas y COCE en humanos, lo que sugiere que una elevada actividad autofágica, lo que podría contribuir a la transformación de las células del epitelio escamoso oral (Nomura et al, 2009).

Es por ello por lo que el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la respuesta ante la administración de 4NQO, un carcinógeno sintético utilizado en modelos murinos para el estudio de la carcinogénesis oral (Kanojia y Vaidya, 20005), en ratones WT y ATG16L1<sup>HM</sup> y de esta manera comparar la respuesta de ambos grupos a diferentes parámetros. Además, el presente trabajo pretende comparar los resultados obtenido al realizar los experimentos tanto en hembras como en machos, disminuyendo el tratamiento con 4NQO a 8 semanas en estos últimos.

El primer parámetro obtenido fue el peso corporal, en la gráfica 1, se muestra el porcentaje de peso corporal monitoreado durante 16 semanas tanto en hembras como en machos. En el caso de las hembras (panel a) no hubo diferencias significativas entre ambos grupos WT 4NQO y ATG16L1<sup>HM</sup> 4NQO, aunque presentaron una baja de peso las primeras semanas en el grupo ATG16L1<sup>HM</sup>, después se recuperaron, en la semana 16 ambos grupos presentaron pérdida peso similar. Por el contrario, los machos (panel b), el grupo ATG16L1<sup>HM</sup> 4NQO tuvieron pérdida de peso significativamente menor que el grupo WT 4NQO, en el caso de los machos al solo ingerir el 4NQO por 8 semanas, no hubo una pérdida de peso en la semana 16 al compararlo con el día 0. La disminución del peso corporal en el



grupo ATG16L1<sup>HM</sup> podría deberse a una dificultad para ingerir alimento y bebida por la progresión de la enfermedad. Como se ha sugerido, la presencia de desarrollo de cáncer en ratones se ve reflejada en los signos clínicos que presentan. Entre ellos destaca la disminución de la ingesta de alimentos y agua, deshidratación y con ellos la pérdida de peso. En estudios previos, se ha encontrado que ratones hembra C57BL/6 que recibieron 4NQO, presentaron poca reducción del peso corporal después de 16 semanas de tratamiento, esto lo asocian con la restricción en la ingesta de alimentos y no directamente con la progresión de la enfermedad (Fernández, 2012; Ludwig et al, 2019).

Por otro lado, se ha encontrado que el 4NQO nos permite producir varias etapas de la formación de COCE en animales experimentales, similar a los cambios histológicos y moleculares que ocurre en los humanos, induce etapas secuenciales de carcinogénesis como lo son la hiperplasia, displasia, displasia severa, carcinoma in situ y SCC. (Kanojia y Vaidya, 2005; Schoop et al, 2009).

En primera instancia, se hizo un análisis macroscópico de lengua y paladar. En el caso de las lenguas de las hembras (figura 7), ambos grupos tanto WT 4NQO como ATG16L1<sup>HM</sup> 4NQO presentaron lesiones precancerosas, correspondientes a leucoplasia, sin embargo, el grupo ATG16L1<sup>HM</sup> 4NQO además de leucoplasia, también presentó tumores más visibles y de mayor tamaño que el grupo WT 4NQO. El grupo ATG16L1<sup>HM</sup> 4NQO presentó una disminución significativa en la longitud de la lengua en comparación con el grupo WT 4NQO. En el caso de los machos (figura 8), ambos grupos WT 4NQO y ATG16L1<sup>HM</sup> 4NQO presentaron leucoplasia y el grupo ATG16L1<sup>HM</sup> 4NQO presentó un pequeño tumor, sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la longitud de la lengua entre los grupos que recibieron 4NQO.

También se hizo un análisis macroscópico de los maxilares de hembras y machos (figura 9 y 10) en donde en ninguno de ellos se observó diferencias significativas al compararlos con los grupos controles. En este caso, debe hacerse un análisis histológico para buscar cambios en las células epiteliales.

Además de los cambios observado a nivel macroscópico, el daño histológico nos permite corroborar el nivel de severidad y avance que tiene la enfermedad. Como lo reportado por Schoop et al (2009), la utilización de 4NQO para producir COCE experimental, trae cambios histológicos en el epitelio oral, similar a lo que ocurre en los humanos. En las

hembras (figura 11), ambos grupos tratados con 4NQO WT y ATG16L1<sup>HM</sup> presentaron cambios histológicos importantes en comparación con los grupos controles, sin embargo, nuevamente es el grupo ATG16L1<sup>HM</sup> el que presentó los cambios son más notorios, con la presencia de un epitelio hiperqueratinizado, en el que no se observan papilas, hay displasia severa, incluso se observa que la membrana basal se comienza a perder, lo que puede deberse a la infiltración de células transformadas. En los machos, los grupos que recibieron que recibieron 4NQO presentaron cambios morfológicos y estructurales, pero el grupo ATG16L1<sup>HM</sup> 4NQO es el que presenta cambios más drásticos (figura 12).

Los datos obtenidos tanto en el análisis macroscópico como histológico, los grupos ATG16L1<sup>HM</sup> 4NQO tanto en hembras como en machos, presentan un avance significativo de la enfermedad en comparación con el grupo WT 4NQO. Los datos sugieren que la expresión disminuida de la proteína ATG16L1 acelera el proceso de carcinogénesis en ratones.

La saliva es un fluido importante para la salud bucal, ya que desempeña una gran variedad de funciones que van desde la lubricación y humectación, homeóstasis y protección bacteriana, participa en la digestión, gusto y olfato, amortiguación, mineralización y cicatrización de heridas. Kaplan et al (2002), sugieren que la saliva tiene capacidad protectora contra el cáncer oral. Este fluido es sintetizado por las glándulas salivales mayores (parotídea, submandibular y sublingual) y menores (labiales, bucales, linguales y palatinas), principalmente en las células acinares (Roblegg et al, 2019).

La saliva está compuesta de 99,5 % de agua, 0,2 % de sales inorgánicas y enzimas y 0,3 % de proteínas. Las proteínas encontradas incluyen amilasa, mucinas, entre otras. En lo que respecta a las mucinas, se identifican dos tipos, MG1 (de alto peso molecular) producida por las células caliciformes en las glándulas submandibulares y sublinguales y MG2 (de bajo peso molecular) producida por las glándulas submandibulares, sublinguales y glándulas menores. Este grupo de mucinas participan en los mecanismos de defensa de la mucosa bucal y se ha encontrado que las mucinas de la glándula submandibular bovina neutralizan los radicales libres (Busch y Borda, 2009; Roblegg et al, 2019).

Cuando una muestra de fluido corporal, como las lágrimas o la saliva se secan se produce un patrón cristalizado en forma de helecho debido a la presencia de estas mucinas. El patrón de mucinas se utiliza para determinar ojo seco, aunque también se ha utilizado en

saliva como método poco confiable para establecer el periodo fértil en mujeres, así como también se ha utilizado en el diagnóstico del Síndrome de Sjögren. Para determinar el patrón de mucinas, se utiliza la prueba de Ferning y se clasifica de acuerdo con el criterio de Rolando, esto permite clasificar el patrón de hehecho en 4 categorías (tipos I, II, III y IV), considerándose los tipos I Y II normales y los tipos III y IV se asocian con procesos patológicos (Masmali et al, 2014; Trinidad et al, 2018).

Ya que, se ha sugerido que la saliva tiene un efecto anticarcinógeno, que retrasa y disminuye el nivel de proliferación celular inducido por 4NQO (Kaplan et al, 2002), se decidió hacer un análisis al microscopio de muestras salivales de ratones para determinar si hay un cambio en el patrón de hehecho ocasionado por el carcinógeno 4NQO. En el patrón de mucinas en las hembras (figura 13), los grupos WT y ATG16L1<sup>HM</sup> control presentaron el tipo II, considerado normales, mientras que WT 4NQO de tipo II-III y ATG16L1<sup>HM</sup> 4NQO de tipo III, la prueba de Ferning sugiere que se asocia a un proceso patológico. Para los machos (figura 14), los grupos control WT y ATG16L1<sup>HM</sup> presentan un patrón de mucinas tipo I-II y los grupos WT 4NQO y ATG16L1<sup>HM</sup> presentan el mismo daño al ser de tipo II-III. Según los datos obtenidos, al consumir 4NQO durante un tiempo determinado, los ratones tanto hembras como machos, presentan un cambio en el patrón de hehecho de la saliva.

Como consecuencia del desarrollo de neoplasias, es frecuente que se presenten alteraciones hematológicas, que se manifiestan como deficiencia en el número de las células sanguíneas. se decidió realizar la cuantificación del hematocrito, con el fin de conocer el porcentaje de glóbulos rojos, los cuales tienen la función de transportar oxígeno a todas las células del cuerpo y la remoción del dióxido de carbono como producto de la oxidación celular. Se conoce que los niveles bajos de estas células provocan anemia, que es la complicación hematológica más frecuente en pacientes con cáncer, la cual puede deberse a sangrado, destrucción y/o descenso de la producción de eritrocitos. Por el contrario, la eritrocitosis es un aumento de glóbulos rojos, lo que ocasiona hiperviscosidad sanguínea con dificultad de flujo intravascular y disminución del aporte de oxígeno a los tejidos, sin embargo, esta última está más asociada a neoplasias productoras de eritropoyetina (Mejía y Alzate, 2016; Peñalver y Martínez, s.f.).

De acuerdo a los resultados obtenidos (grafica 2), no hay diferencias significativas con respecto al porcentaje de eritrocitos entre los grupos WT 4NQO y ATG16L1<sup>HM</sup> 4NQO

tanto de hembras como de machos, sin embargo, los datos son inconclusos y no nos permiten analizar si hay una alteración en el número de células rojas con la ingesta de 4NQO.

En las reacciones inmunitarias, los linfocitos T juegan un papel importante en la eliminación de células tumorales. Existen dos principales clases de linfocitos T, CD4+ y CD8+, los cuales actúan de formas diferentes y complementarias, en el caso de los linfocitos T efectores CD4+ constan de subpoblaciones de linfocitos cooperadores: Th1, Th2 y Th17, los cuales actúan por distintas citocinas secretadas. La alteración de las respuestas inmunitarias Th1 y Th2, podría facilitar el desarrollo y progresión del cáncer (Abbas et al, 2022; Kwon et al, 2015).

La IL-4, es una citocina Th2, que actúa como un factor de supervivencia autocrino por la vía de señalización Stat6, lo que resulta en resistencia a la apoptosis inducida por el ligando de muerte. Por lo que IL-4 está asociado con la progresión de varios tipos de carcinomas. En el caso del cáncer oral, se ha encontrado una alta expresión de IL-4Ra (receptor de interleucina 4) en muestras de tumor primario, en otro estudio se encontró mayor expresión de IL-4 en sangre periférica de pacientes con COCE (Kwon et al, 2015; Manchanda et al, 2006). Es por ello que se obtuvo la concentración de IL-4 por ELISA en órganos linfoides secundarios. En células totales de bazo y ganglio cervical no estimulados de hembras, fue mayor la concentración de IL-4 en el grupo ATG16L1<sup>HM</sup> 4NQO que en el grupo WT 4NQO (Grafica 3a y 4a), lo que puede sugiere que su alta concentración puede ser un factor de progresión de carcinogénesis en el grupo ATG16L1<sup>HM</sup>, sin embargo, los datos no son significativos.

En el caso del cultivo celular de células totales de bazo y ganglio cervical de hembras estimuladas con concanavalina A, se encontró una mayor concentración de IL-4 en el grupo WT 4NQO que en ATG16L1<sup>HM</sup> 4NQO (Grafica 3b y 4b). Se decidió utilizar concanavalina A debido a que es un agente mitogenico, que estimulan la proliferación de linfocitos T de manera policlonal por la interacción con el receptor TCR que induce a las células a la replicación del DNA. La baja concentración de IL-4 en el grupo ATG16L1<sup>HM</sup> 4NQO podría deberse a un agotamiento de linfocitos T, lo que provoca que la estimulación de estos produce menor capacidad de proliferación y menor producción de citocinas, esto contribuye a que los tumores puedan evadir la respuesta inmune, aunque, los datos no son estadísticamente significativos (Abbas et al, 2022; Carvalho et al, 2018).

Se determinó la concentración de IL-4 en suero sanguíneo a las 16 semanas tanto en hembras como en machos (grafica 5). En hembras hubo mayor concentración de IL-4 en el grupo WT 4NQO que en el grupo ATG16L1<sup>HM</sup> 4NQO. En el caso de los machos no hubo diferencias significativas entre ambos grupos. En este caso, la alta concentración de IL-4 en hembras podría deberse a que hay otras poblaciones celulares produciendo IL-4, ya que esta interleucina puede ser secretada principalmente por mastocitos, células Th2, eosinófilos y basófilos (Gadani et al, 2018).

De igual manera se cuantificó la concentración de IL-15 en suero sanguíneo a las 16 semanas y cultivo celular de células totales ganglio cervical de ratones hembra estimulados con concanavalina A. Debido a que esta participa en la inmunidad innata, mediada por neutrófilos, monocitos/macrófagos y por células asesinas naturales (NK), y en la inmunidad adaptativa, mediada por linfocitos T y B. Esta citosina tiene la capacidad de promover la diferenciación y expansión de linfocitos T, linfocitos B y células NK, que conducen a respuestas antitumorales, lo que la hace una excelente candidata para la terapia contra el cáncer. Se ha encontrado, que la IL-15, contribuye a la infiltración de células CD8<sup>+</sup> para la inhibición tumoral en melanoma humano, así como la pérdida de IL-15 en tumores colorrectales se relaciona con una menor proliferación de células T, mayor recurrencia de tumores y con ello menor supervivencia en pacientes. Sin embargo, se ha encontrado que una alta concentración de IL-15 intratumoral en pacientes con cáncer de cabeza y cuello, está relacionado con un mal resultado clínico, esto debido a la amplificación de la respuesta antiinflamatoria (Badoual et al, 2008; Guo et al, 2021, Isvoranu et al, 2021; Santos, 2006).

En nuestros resultados, se encontró una mayor concentración de IL-15 en el grupo WT 4NQO (grafica 6). Lo que nos puede sugerir que hay una mayor proliferación de células con actividad antitumoral producidas por la IL-15 en este grupo, que en el grupo ATG16L1<sup>HM</sup> 4NQO.

Los linfocitos son las principales células efectoras inmunes en carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (COCECC), lo que sugiere un vínculo entre el desarrollo del carcinoma y la alteración de la respuesta inmunitaria antitumoral. Al igual que los linfocitos T, los linfocitos B tienen un papel fundamental en el desarrollo del cáncer. Entre sus funciones esta la producción de inmunoglobulinas, la presentación de antígenos y la secreción de citocinas proinflamatorias. Por lo que, en cáncer, pueden ser antitumorales o ser

promotores de tumores. Los estudios en cánceres humanos han mostrado que la densidad de células B, se relaciona con un pronóstico favorable, en el caso del COCE, se ha encontrado una alta densidad de linfocitos B CD20+ en tumores, lo cual asocian a un buen pronóstico de la enfermedad, en otro estudio, se observa una reducción del nivel de linfocitos B CD19+ en sangre de pacientes con COCE, en comparación con un grupo sano. En algunos modelos murinos, las células B y sus anticuerpos, pueden favorecer a la aparición y propagación del cáncer, en ratones con carcinoma de células escamosas (CCE), se ha encontrado que las células B fomentan la carcinogénesis, ya que al aplicar ratones con agotamiento de células B se evita la progresión neoplásica (Affara et al, 2014; Caruntu et al, 2022; Fridman et al, 2020; Suárez et al, 2021).

En los resultados obtenidos en la citometría de flujo realizada en bazo de ratones hembra (grafica 7), hay un porcentaje elevado de linfocitos en el grupo ATG16L1<sup>HM</sup> 4NQO en comparación con el grupo WT 4NQO. De igual manera, se encontró un mayor porcentaje de linfocitos B en el grupo ATG16L1<sup>HM</sup> 4NQO. Los datos nos muestran el papel que tiene los linfocitos en el desarrollo del cáncer, principalmente los linfocitos B. Los resultados pueden sugerir que los linfocitos B fomentan la carcinogénesis en el grupo ATG16L1<sup>HM</sup>.

## **9. CONCLUSIÓN**

La expresión reducida de la proteína ATG16L1 en ratones de ambos sexos resulta en un proceso acelerado de carcinogénesis en la cavidad oral. La inducción de esta proteína podría contribuir de manera positiva en el pronóstico de cáncer de células escamosas en la cavidad oral.

## 10. LITERATURA CITADA

Abbas A., Lichtman A. y Pillai S. (2022). *Inmunología celular y molecular* (10a ed.). Elsevier.

Affara N., Ruffell B., Medler T., Gunderson A., Johansson M., Bornstein S., Bergsland E., Steinhoff M., Li Y., Gong O., Ma Y., Wiesen J., Wong M., Kulesz M., Irving B. y Coussens L. B cells Regulate Macrophage Phenotype and Response to Chemotherapy in Squamous Carcinomas. *Cancer Cell*, 25(6): 809–821.

Badoual C., Bouchaud G., Agueznay N., Mortier E., Hans S., Gey A., Fernani F., Peyrard S., Laurent-Puig P., Bruneval P., Sastre X., Plet A., Garrigue-Antar L., Quintin-Colonna F., Fridman W., Brasnu D., Jacques Y. y Tartour E. (2008). The Soluble A Chain of Interleukin 15 Receptor: A Proinflammatory Molecule Associated with Tumor Progression in Head and Neck Cancer. *Cancer Research*, 68 (10), 3907–3914.

Bestebroer J., V'kovski P, Mauthe M. y Reggiori F. (2013). Hidden Behind Autophagy: The Unconventional Roles of ATG Proteins. *Traffic*, 14(10), 1029–1041.

Busch L. y Borda E. (2009). Mucinas salivales: estructura química, mecanismos de liberación y participación en la defensa no inmunológica de la cavidad bucal. *Revista de la Facultad de Odontología*, 24 (56/57), 9-16.

Carrillo J., Simón E., Gil M. y Rodríguez M. (2011). Cáncer oral en México. Revisión bibliográfica y presentación de caso clínico. *Revista Mexicana de Cirugía Bucal y Maxilofacial*, 7 (3), 104-108.

Caruntu, A., Moraru, L., Surcel, M., Munteanu, A., Costache, D., Tanase, C., Constantin, C., Scheau, C., Neagu, M. y Caruntu, C. (2022). Persistent Changes of Peripheral Blood Lymphocyte Subsets in Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma. *Healthcare*, 10(2), 342.



- Carvalho E, Oliveira W., Coelho L. y Correia M. (2018). Lectins as mitosis stimulating factors: Briefly reviewed. *Life Sciences*, 15(207), 152-157.
- Fernández M. (2012). Utilización de Modelos animales en investigación del Cáncer. *Salud Militar*, 31(1), 55-58.
- Fridman W., Petitprez F., Meylan F., Chen T., Sun C-M., Roumenina L. y Sautès-Fridman C. (2020). B cells and cancer: To B or not to B?. *Journal of Experimental Medicine*, 218(1).
- Gadani S., Cronk J., Norris G. y Kipnis J. (2012). IL-4 in the brain: a cytokine to remember. *The Journal of Immunology*, 189(9), 4213–4219.
- Gammoh N. (2020). The multifaceted functions of ATG16L1 in autophagy and related processes. *The Company of Biologists*, 133 (20).
- García L., Caneiro F. y Gallego R. (2019). Cancer oral. Concepto y generalidades. Aspectos histopatológicos. En P. López & J. Seoane (1er Ed.), *Cáncer oral para dentistas* (17-24). Fundación Dental Española.
- García V. y Bascones A. (2009). Cáncer oral: Puesta al día. *Avances en odontoestomatología*, 25 (5), 239-248.
- Guol J., Liang Y., Xuel D., Shen J., Cail Y., Zhu J., Fu Y-F. y Peng H. (2021). Tumor-conditional IL-15 pro-cytokine reactivates anti-tumor immunity with limited toxicity. *Cell Research*, 31(11), 1190-1198.
- Isvoranu G., Surcel M., Munteanu A., Bratu O., Ionita-Radu F., Neagu M. y Chiritoiu-Butnaru M. (2021). Therapeutic potential of interleukin-15 in cancer (Review). *Experimental and Therapeutic medicine*, 22(1), 675.

- Kanojia D y Vaidya M. (2005). 4-Nitroquinoline-1-oxide induced experimental oral carcinogénesis. *Oral Oncology*, 42(7), 655-667.
- Kaplan I., Hochstadt T. y Dayan D. (2002). PCNA en lesiones displásicas de la mucosa de la lengua y del paladar inducidas por aplicación tópica de 4NQO en ratas desalivadas. *Medicina Oral*, 7(5), 336-43.
- Kwon M., Kim J., Roh J-L., Park Y., Cho K-J., Cho S-H, Nam S., Kim S. y Lee B-H. (2015). Recurrence and cancer-specific survival according to the expression of IL-4Ra and IL-13Ra1 in patients with oral cavity cancer. *European Journal of Cancer*, 51(2), 177–185.
- Ludwig S., Hong C-S, Razzo B., Fabian K., Chelvanambi M., Lang S., Storkus W. y Whiteside T. (2019). Impact of combination immunochemotherapies on progression of 4NQO-induced murine oral squamous cell carcinoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 68(7), 1133-1141.
- Manchanda P., Sharma S. y Das S. (2006). Differential regulation of IL-2 and IL-4 in patients with tobacco-related oral squamous cell carcinoma. *Oral Diseases*, 12(5), 455–462.
- Masmali A., Purslow A. y Murphy P. (2014). The tear ferning test: a simple clinical technique to evaluate the ocular tear film. *Clinical and Experimental Optometry*, 97(5),399-406.
- Mejía M. y Alzate M. (2016). Clasificación automática de formas patológicas de eritrocitos humanos. *Ingeniería*, 21(1), 31–48.
- Montero P. y Patel S. (2015). Cancer of the oral cavity. *Surgical Oncology Clinics*, 24(3), 491–508.

- Nomura H., Uzawa K., Yamano Y., Fushimi K., Ishigami T., Kouzu Y., Koike H., Siiba M., Bukawa H., Yokoe H., Kubosawa H. y Tanzawa H. (2009). Overexpression and altered subcellular localization of autophagy-related 16-like 1 in human oral squamous-cell carcinoma: correlation with lymphovascular invasion and lymph-node metastasis. *Human Pathology*, 40(1), 83–91.
- Parzych K. y Klionsky D. (2014). An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(3), 460–473.
- Peña M. y Bautista J. (2013). Autofagia y respuesta inmunitaria. *Investigacion Clinica*, 54(3), 325 - 337.
- Peñalver F. y Martínez P. (s.f.). Síndromes paraneoplásicos hematológicos. En N. Rodríguez y R. de las Peñas. Síndromes paraneoplásicos (28-45). Grupo Español de Tumores Huérfanos e Infrecuentes (GETHI).
- Rabinovich G., Salatino M. y Ilarregui J. (2013). Inmunidad y Cáncer. En L. Fainboim y J. Geffner (6ta Ed.). *Inmunología Humana* (439-446). Editorial medica panamericana.
- Rhodus, N., Kerr, R. y Patel, K. (2014). Oral Cancer: Leukoplakia, Premalignancy, and Squamous Cell Carcinoma. *Dental Clinics of North America*, 58(2), 315-340.
- Rivera C. (2015). Essentials of oral cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(9), 11884–11894.
- Roblegg E., Coughranb A. Y Sirjanib D. (2019). Saliva: An all-rounder of our body. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 142, 133–141.
- Saitoh T., Fujita N., Ho Jang M., Uematsu S., Yang B., Satoh T., Omori H., Noda T., Yamamoto N., Komatsu M., Tanaka K., Kawai T., Tsujimura T., Takeuchi O.,

- Yoshimori T. y Akira S. (2008). Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL- IL-1b production. *Nature*, 456(7219), 264-269.
- Santos A. (2006). Interleucina-15: una citocina relevante en la homeostasis linfoide y en enfermedades autoinmunes. *Biología Aplicada*, 23(2), 79-86.
- Schoop R., Noteborn M. y Baatenburg R. (2009). A mouse model for oral squamous cell carcinoma. *Journal of Molecular Histology*, 40(3), 177–181.
- Sidrón, M. y Pérez, S. (2015). Cáncer oral: Genética, prevención, diagnóstico y tratamiento. Revisión de la literatura. *Avances en Odontología*, 31(4), 247-259.
- Suárez F., Lequerica P., Rodrigo, J., Hermida F.; Suárez J., Rodríguez T., Domínguez F., García J. y Vicente, J. (2021). Tumor-Infiltrating CD20+ B Lymphocytes: Significance and Prognostic Implications in Oral Cancer Microenvironment. *Cancers*, 13(3), 395.
- Trinidad N., Ramos O., Navarro P., Trujillo J. y Vázquez A. (2018). Asociación negativa entre Demodex y Ferning en apoyo al diagnóstico de ojo seco. *Actas del Congreso Nacional de Tecnología Aplicada a Ciencias de la Salud*, 1.
- World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. Global Cancer Observatory (GLOBOCAN). (2020). Estimated number of new cases in 2020, lip, oral cavity, both sexes, all ages. <http://gco.iarc.fr/>.
- Wu J-S., Li L., Wang S., Pang X., Wu J-B., Sheng S, Tang Y-J., Tang Y-L., Zheng M. y Liang X. (2018). Autophagy is positively associated with the accumulation of myeloid-derived suppressor cells in 4-nitroquinoline-1-oxide-induced oral cancer. *Oncology Reports*, 40(6), 3381-3391.

## ANEXO TÉCNICO

### 1. ANEXO 1. TREN DE DESHIDRATACIÓN E INCLUSIÓN DE TEJIDOS

1. Agua corriente	30 min
2. Alcohol 50%	30 min
2. Alcohol 60%	20 min
3. Alcohol 70%	20 min
4. Alcohol 75%	20 min
5. Alcohol 80%	20 min
6. Alcohol 85%	20 min
7. Alcohol 90%	20 min
8. Alcohol 100% I	20 min
9. Alcohol 100% II	20 min
10. Alcohol amílico I	20 min
11. Alcohol amílico II	20 min
12. Parafina I	24 hrs a 54°C
13. Parafina II	24 hrs
14. Inclusión	

### 2. ANEXO 2. TREN DE TINCIÓN HEMATOXILINA Y EOSINA

1. Xilol I	15 min
2. Xilol II	10min
3. Alcohol 100%	10 lavadas
4. Alcohol 90%	10 lavadas
5. Alcohol 80%	10 lavadas
6. Alcohol 70%	10 lavadas

7. Agua corriente	10 lavadas
8. Hematoxilina	15 por min
9. Agua corriente	10 lavadas
10. Alcohol acido	1 lavada
11. Agua corriente	10 lavadas
12. Carbonato de litio	1 lavada
13. Agua corriente	1 lavada
14. Alcohol 100%	10 lavadas
15. Eosina	7 min
16. Alcohol 70%	10 lavadas
17. Alcohol 80%	10 lavadas
18. Alcohol 90%	10 lavadas
19. Alcohol 100%	10 lavadas
20. Xilol III	10 lavadas
21. Xilol IV	Hasta montar
22. Montar con Entellan	